

Einflüsse auf die Tau-Pathologie im FTDP-17-Mausmodell

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)



dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Stefanie Müßner

aus Marburg

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am 21.12.2016.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. W. Oertel

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. H.-P. Elsässer

2. Korreferent: Herr Prof. Dr. D. Oliver

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Tau	5
1.1.1 Genetik.....	5
1.1.2 Struktur und Funktion	7
1.1.3 Posttranslationale Tau-Phosphorylierung	10
1.1.3.1 Tau-Kinasen.....	10
1.1.3.2 Tau-Phosphatasen.....	12
1.1.4 Weitere posttranslationale Modifikationen des Tau-Proteins.....	13
1.1.5 Pathologische Aggregation des Tau-Proteins	14
1.2 Tauopathien.....	16
1.2.1 Neuropathologie	18
1.2.2 Biochemisches Profil	18
1.2.3 Klinisch-neuropathologische Merkmale häufiger Tauopathien	20
1.2.3.1 Alzheimer-Erkrankung	20
1.2.3.2 Progressive supranukleäre Blickparese	20
1.2.3.3 Kortikobasale Degeneration	21
1.2.3.4 Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosoms 17	23
1.3 Ätiologie der Tauopathien	24
1.3.1 Einfluss genetischer Faktoren	24
1.3.1.1 MAPT-Mutationen und deren funktionelle Auswirkungen	24
1.3.1.2 Tau-Haplotypen.....	27
1.3.1.3 R406W-Mutation	27
1.3.2 Einfluss von Umweltfaktoren.....	30
1.3.2.1 Atypischer Parkinsonismus auf Guadeloupe	30

1.3.2.2	Histologisches und biochemisches Profil des atypischen Parkinsonismus auf Guadeloupe	32
1.3.2.3	Ätiologie des atypischen Parkinsonismus auf Guadeloupe	33
1.3.2.4	Acetogenine	33
1.3.2.5	Tropische Foci von atypischem Parkinsonismus.....	36
1.4	Ziel der Arbeit	37
2	Material und Methoden	39
2.1	Materialien und Bezugsquellen	39
2.1.1	Antikörper	39
2.1.2	Chemikalien.....	40
2.1.3	Lösungen	41
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	41
2.1.5	Geräte und Zubehör.....	42
2.2	Methoden	43
2.2.1	Versuchstiere	43
2.2.2	Komplex I-Inhibition.....	44
2.2.3	Annonacinexposition	44
2.2.4	Gewebepräparation	46
2.2.5	Immunhistochemie	46
2.2.6	Stereologische Analyse	47
2.2.6.1	<i>Optical Fractionator</i> -Methode.....	47
2.2.6.2	<i>Coefficient of Error</i> nach Gundersen.....	50
2.2.7	Optische Dichtemessung	52
2.2.8	Statistische Analyse.....	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Annonacin-induzierte Mortalität.....	54

3.2 Erhöhte Phospho-Tau-Immunreaktivität in neuronalen Somata transgener Tiere	54
3.3 Annonacin erhöht Phospho-Tau in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund	56
3.4 Fehlender Annonacin-Effekt in der Amygdala.....	59
3.5 Annonacin und neuronaler Zelltod.....	60
3.6 Annonacin und Neuroinflammation	62
4 Diskussion	65
4.1 Auswahl des Untersuchungsmodells.....	65
4.2 Neuropathologische Auswirkungen der Annonacinbehandlung	67
4.3 Mechanismen der Phospho-Tau-Akkumulation	69
4.4 Relevanz einer Exposition gegenüber Umwelttoxinen	75
4.5 Relevanz der Arbeit und Ausblick	78
5 Zusammenfassung.....	80
6 Summary.....	82
7 Literaturverzeichnis.....	84
8 Anhang.....	98
8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer	98
8.2 Danksagung.....	99

1 Einleitung

Als Tauopathien bezeichnet man eine heterogene Gruppe chronisch-progressiver neurodegenerativer Erkrankungen, deren gemeinsames neuropathologisches Charakteristikum die intrazelluläre Ablagerung filamentöser Aggregate des Mikrotubuli-assoziierten Tau-Proteins ist (Lee et al., 2001). Die Gruppe der Tauopathien umfasst sowohl sporadische, als auch hereditäre Formen verschiedener Erkrankungen, wie zum Beispiel der Alzheimer Demenz (AD), der kortikobasalen Degeneration (CBD), des Morbus Pick (PiD), der progressiven supranukleären Blickparese (PSP) und der frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17).

Die Pathogenese bestimmter familiärer Formen von Tauopathien kann weitgehend auf genetische Einflüsse zurückgeführt werden. So handelt es sich bei der FTDP-17 um eine autosomal dominant vererbte Gruppe seltener familiärer Tauopathien, die nachweislich mit verschiedenen Mutationen im Tau-Gen assoziiert sind (Goedert und Jakes, 2005). Es liegen jedoch Berichte über sporadische Fälle von Tauopathien vor, in denen derartige Genmutationen nicht nachweisbar sind und die auf die Existenz weiterer bisher unbekannter genetischer Ursachen und/oder auslösender Umweltfaktoren schließen lassen.

Beispielhaft für eine durch Umweltfaktoren verursachte Tauopathie ist ein Bericht über das gehäufte Auftreten einer atypischen Parkinsonerkrankung auf der karibischen Insel Guadeloupe, die klinisch und neuropathologisch einer PSP-verwandten Tauopathie gleicht (Caparros-Lefebvre et al., 2002). Die Überrepräsentation der Erkrankung auf Guadeloupe konnte mit dem vermehrten Verzehr von tropischen Pflanzen aus der Familie der Annonaceae (Stachelannonen) in Verbindung gebracht werden (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Lannuzel et al., 2007). Früchte und Blätter dieser Pflanzen enthalten neurotoxisch wirkende Substanzen, die Acetogenine, welche eine Komplex I-Inhibition der Atmungskette verursachen. *In vitro*- und *in vivo*-Experimente konnten zeigen, dass Annonacin, eine Substanz aus der Gruppe der Acetogenine, die aus der Pflanze *Annona muricata* extrahiert werden kann, zu neuronalem Zellverlust und der Ablagerung filamentöser Tauaggregate führt (Champy et al., 2004; Escobar-Khondiker et al., 2007).

Die genannten experimentellen Daten legen nahe, dass sowohl genetische Mutationen des Tau-Gens als auch die Exposition gegenüber Umweltfaktoren zur Ätiopathogenese der

Tauopathien beitragen. Ob und in welchem Maße dabei ein Synergismus zwischen endogenen und exogenen Einflussfaktoren besteht, beziehungsweise inwieweit der genetische Hintergrund die Suszeptibilität gegenüber Umweltgiften zu erhöhen vermag, soll die vorliegende Arbeit klären. Zur Klärung der Fragestellung wurde ein transgenes Mausmodell verwendet, das humanes Tau mit der R406W-Punktmutation überexprimiert.

1.1 Tau

Tauproteine gehören zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP). Sie werden vor allem in den Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert und spielen eine bedeutende Rolle bei der Polymerisation von Tubulindimeren zu stabilen Mikrotubuli (Weingarten et al., 1975). Durch Interaktion mit den Mikrotubuli leisten sie somit einen entscheidenden Beitrag zum Erhalt des Zytoskeletts und des axonalen Transports. Unter physiologischen Bedingungen sind die Tauproteine in den Axonen der Neurone lokalisiert. Im Soma und den Dendriten der Neurone oder in nicht-neuronalen Zellen sind sie hingegen kaum nachweisbar (Binder et al., 1985).

1.1.1 Genetik

Die humanen Tauproteine werden alle durch ein einziges Gen auf Chromosom 17q21 kodiert (Neve et al., 1986). Das primäre Transkriptionsprodukt dieses Gens besteht aus 16 Exons. Durch alternatives Spleißen von 11 dieser 16 Exons entstehen die verschiedenen Isoformen des Tau-Proteins (Andreadis et al., 1992). Insgesamt gibt es im menschlichen Gehirn sechs verschiedene Tau-Isoformen, die durch alternatives Spleißen von Exon (E)2, E3 und E10 entstehen und zwischen 352 und 441 Aminosäuren lang sind (Goedert et al., 1989a). Resultierend aus dem alternativen Spleißen von E10 unterscheiden sich die Isoformen anhand der Anzahl der Tubulin-bindenden Einheiten im C-terminalen Bereich. Je nachdem ob E10 Teil des Transkriptionsproduktes ist oder nicht, entstehen so Isoformen mit drei (3R-Tau) oder vier (4R-Tau) C-terminalen Tubulin-bindenden Einheiten, von denen jede 31 bis 32 Aminosäuren lang ist und die durch E9, E10, E11 und E12 kodiert werden (Goedert et al., 1989a; Goedert et al., 1989b). Zusätzlich werden durch alternatives Spleißen von E2 und E3 keine (0N), eine (1N) oder zwei (2N) 29 Aminosäuren lange Abschnitte im aminoterminalen

Bereich des Proteins eingefügt. Diese Insertionen treten sowohl in Kombination mit 3R- als auch mit 4R-Tau auf, so dass insgesamt sechs verschiedene Tau-Isoformen aus dem primären Transkript entstehen können (2- 3- 10-; 2+ 3- 10-; 2+ 3+ 10-; 2- 3- 10+; 2+ 3- 10+; 2+ 3+ 10+, siehe Abb.1) (Goedert et al., 1989a).

Jede dieser Isoformen erfüllt offenbar eine bestimmte physiologische Rolle, denn ihre Expression variiert im Verlauf der Hirnentwicklung. So sind im Gehirn eines Erwachsenen alle sechs Isoformen zu finden, wobei 3R- und 4R-Tau etwa im Verhältnis 1:1 exprimiert werden und die kürzeren Isoformen (0N,1N) häufiger zu finden sind als die längeren (2N) (Goedert und Jakes, 1990; Hong et al., 1998). Im fetalen Gehirn hingegen wird lediglich die kürzeste Tau-Isoform (3R/0N) exprimiert. Ebenso zeigen sich unterschiedliche Verteilungsmuster innerhalb verschiedener neuronaler Zellpopulationen. Zum Beispiel werden in den Körnerzellen des Gyrus dentatus zwar 3R- jedoch keine 4R-Isoformen exprimiert (Goedert et al., 1989b). Insgesamt folgt die Verteilung der Isoformen somit einem stadien- und zellspezifischen Expressionsmuster.

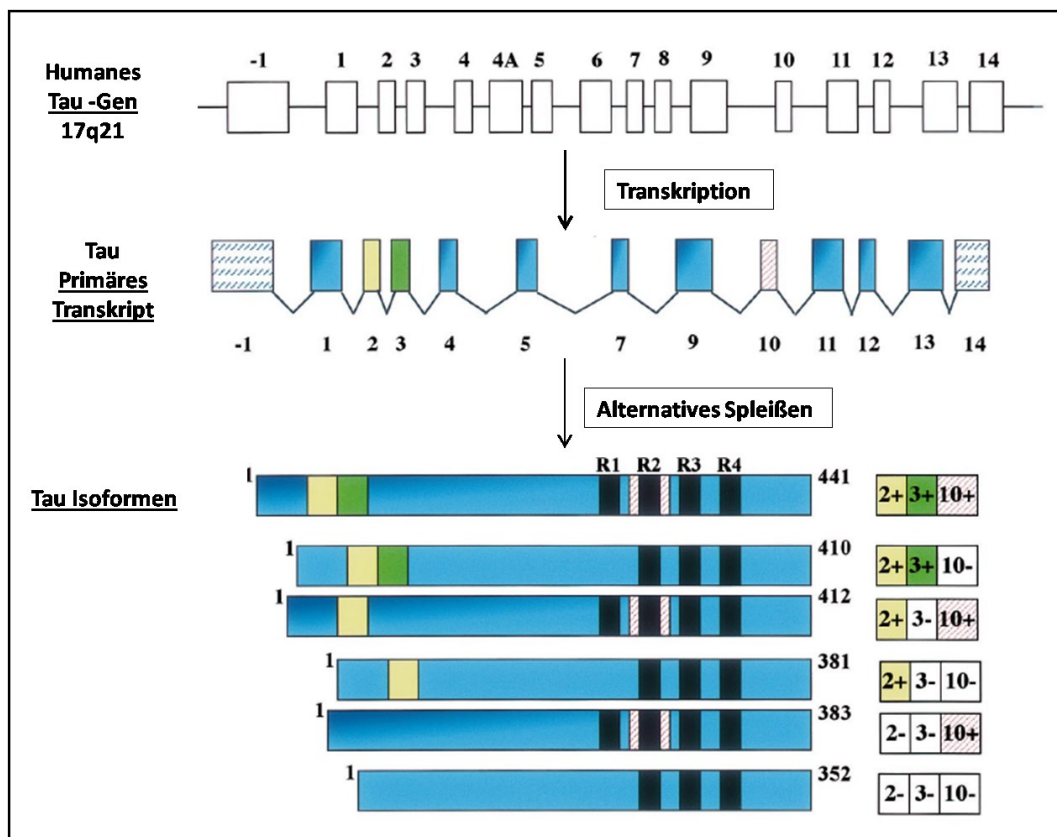


Abb. 1 Schematische Repräsentation des Tau-Gens, des primären Transkriptionsproduktes und der sechs humanen Tau-Isoformen, nach Buée et al., 2000

1.1.2 Struktur und Funktion

Die Hauptfunktion des Tau-Proteins liegt in der Promotion der Mikrotubuli (MT)-Polymerisation und der Stabilisierung des MT-Netzwerks, welches als Leitstruktur für den axonalen Transport von Neurovesikeln einen essentiellen Bestandteil von Neuronen darstellt (Cleveland et al., 1977b; Weingarten et al., 1975). Dabei beeinflusst Tau das dynamische Äquilibrium des MT-Auf- und Abbaus durch direkte Interaktion mit den Tubulineinheiten. Die Bindung des Tau-Proteins an die MT wird durch C-terminal gelegene repetitive Sequenzen vermittelt. Bei diesen handelt es sich um die durch E9 bis E12 kodierten Tubulin-bindenden Einheiten (R1-R4). Jede dieser Einheiten besteht aus hochkonservierten 18 Aminosäuren langen Bindeelementen, die durch weniger konservierte 13 bis 14 Aminosäuren lange Zwischensequenzen getrennt sind (Butner und Kirschner, 1991; Himmler et al., 1989; Lee et al., 1989). Verteilt innerhalb der Bindeelemente liegen zahlreiche schwache MT-Bindungsstellen, bestehend aus wenigen Aminosäuren, durch die die MT-Bindung vermittelt wird und deren flexible Anordnung eine dynamische Interaktion ermöglicht (Butner und Kirschner, 1991). Darüber hinaus wird die Bindung durch die Beteiligung von in Nachbarschaft zu den Bindeelementen gelegenen Regionen verstärkt (Gustke et al., 1994). *In vitro*-Studien zeigen, dass Tau durch die Bindung an Tubulindimere deren lokale Konzentration erhöht und so die Polymerisation zu longitudinalen Filamenten fördert (Cleveland et al., 1977a). Gleichzeitig wird der Übergang in die Depolarisationsphase vermindert und die Depolarisation der MT inhibiert (Drechsel et al., 1992). Hat sich einmal ein stabiles MT-Netzwerk ausgebildet, wie es in reifen Axonen benötigt wird, supprimiert Tau das weitere Wachstum und die Verkürzung der MT und trägt so zum Erhalt eines *steady state* bei (Panda et al., 1995).

Aufgrund einer stärkeren MT-Bindungsaffinität der 4R-Isoformen ist die Effizienz der Polymerisation im Vergleich zu 3R-Isoformen gesteigert (Goedert und Jakes, 1990). Die Bindungsaffinität der 4R-Isoformen wird durch eine zwischen der ersten und zweiten Tubulin-bindenden Einheit liegende Region (R1-R2-Zwischensequenz) vermittelt. Diese Zwischensequenz wird nur in 4R-Tau exprimiert und besitzt eine mehr als doppelt so starke Bindungsaffinität als jede der Tubulin-bindenden Einheiten (Goode und Feinstein, 1994).

An die Tubulin-bindende Region schließen sich eine Prolin-reiche Region, die ebenfalls zur MT-Bindung beiträgt, und eine saure N-terminale Region, welche als Projektionsdomäne bezeichnet wird, an. Die variable Länge und Azidität dieser N-terminalen Region wird durch

die 29 Aminosäuren langen Abschnitte, die durch E2 und E3 kodiert werden, bestimmt. Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung steht die negativ geladene N-terminale Region als Projektionsdomäne von der MT-Oberfläche ab. Die positiv geladene Prolin-reiche Region hingegen bindet stark an die negativ geladene MT-Oberfläche. Sie stellt die Verbindung zur an der inneren Oberfläche der MT bindenden C-terminalen Region her, deren Tubulin-bindende Einheiten dort spezielle Bindungsstellen des β -Tubulin besetzen und durch Kreuzverknüpfung von drei bis vier Tubulindimeren benachbarter Protofilamente zur Stabilisierung der MT beitragen (Amos, 2004; Kar et al., 2003). Zusammen mit der an der äußeren Oberfläche bindenden Prolin-reichen Region, die die Heterodimere entlang eines Protofilaments stabilisiert, erhöht Tau so die Steifheit der MT (*stiffening effect*) und erhält deren charakteristische Konformation (Amos, 2004; Felgner et al., 1997).

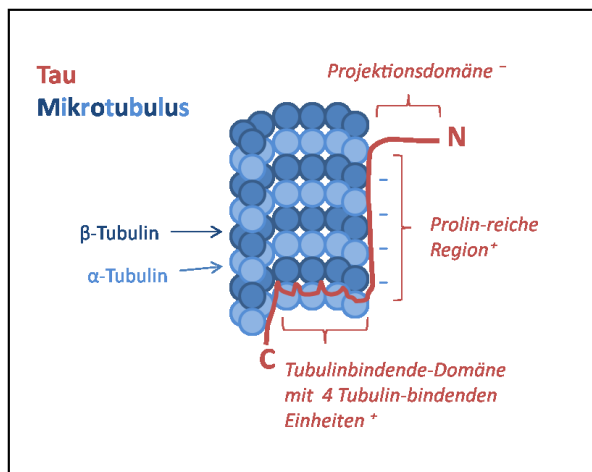


Abb. 2 Schematisches Modell der Interaktion eines Tau-Moleküls mit einem Mikrotubulus

Die Abbildung zeigt einen Mikrotubulus-Ausschnitt mit Blick auf die innere Oberfläche. In rot dargestellt ist ein 4R-Taumolekül, das sich entsprechend seiner unterschiedlich geladenen Domänen an die MT-Oberfläche anlagert (Amos, 2004).

Die Projektionsdomäne bestimmt den Abstand zwischen den einzelnen MT in Axonen. Durch ihre variable Länge (0N-, 1N- oder 2N-Isoformen) nimmt sie direkten Einfluss auf den Axondurchmesser (Chen et al., 1992). Der größere axonale Durchmesser peripherer Neurone ist durch Expression eines Tau-Proteins mit höherer relativer Molekülmasse bedingt (auch „big tau“ genannt). Die Transkription von Exon 4a führt zur Insertion einer zusätzlichen Aminosäuren-Sequenz im Bereich der Projektionsdomäne und somit zu einem größeren Abstand zwischen den MT (Georgieff et al., 1993). Neben ihrer Bedeutung für die Stabilisierung und Organisation von Axonen dient die Projektionsdomäne auch der

Interaktion mit anderen Komponenten des Zytoskeletts und der Plasmamembran (Brandt et al., 1995). Durch die Bindung an Spektrin und Aktin (Carlier et al., 1984; Henriquez et al., 1995) oder die Verknüpfung mit Neurofilamenten (Aamodt und Williams, 1984) erfährt das MT-Netzwerk somit zusätzliche Stabilität. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass Tau auch die Interaktion mit Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, ermöglicht (Rendon et al., 1990). Darüber hinaus beeinflusst Tau als Mediator zwischen MT und Plasmamembran via Interaktion mit Membran-assoziierten Proteinen verschiedene Signaltransduktionsmechanismen. Es ist in der Lage über ein PXXP-Motiv im Bereich der Prolin-reichen Region an die SH3-Domäne von Src-Tyrosinkinasen (Fyn, Lck und Src) zu binden. Der Tau-Tyrosinkinase-Komplex wiederum ist mit dem submembranösen Aktin-Zytoskelett assoziiert und nimmt über Veränderungen des Zytoskeletts Einfluss auf die Zellmorphologie. Eine besondere Anreicherung an Tau-Tyrosinkinase-Komplexen im Bereich des Wachstumskonus sorgt in Abhängigkeit von extrazellulären Signalen für Veränderungen des lokalen Aktin-Zytoskeletts, die durch die Invasion von MT das axonale Wachstum erleichtern (Lee et al., 1998). Ebenso greift Tau in den durch die Phospholipase C- γ (PLC- γ) vermittelten Signaltransduktionsmechanismus ein. In Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren führt die Komplexbildung mit der SH3-Domäne der PLC- γ zu gesteigerter Enzymaktivität und einer von der Tyrosin-Phosphorylierung des Enzyms unabhängigen, indirekten Aktivierung (Hwang et al., 1996).

Auch die MT-bindende Domäne interagiert mit weiteren Proteinen und Enzymen, wie der Proteinphosphatase 2A (PP2A), welche an die gleiche Tau-Domäne bindet wie die MT. Die Bindung von MT führt zu einer kompetitiven Inhibition der Enzymaktivität, worüber der Phosphorylierungszustand des Tau-Proteins reguliert wird (Sontag et al., 1999). An dieser Regulation ist auch Präsenilin 1 (PS1) beteiligt, welches ebenfalls an die MT-bindende Domäne bindet. Durch simultane Bindung der Gykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) nähert PS1 die GSK-3 β und Tau einander an und erhöht dadurch die Kinaseaktivität und den Phosphorylierungszustand des Tau-Proteins (Takashima et al., 1998). Die Interaktion der MT-bindenden Domäne mit verschiedenen Proteinen beeinflusst auf diese Weise den Phosphorylierungszustand des Tau-Proteins und damit wiederum seine Funktion.

1.1.3 Posttranslationale Tau-Phosphorylierung

Das menschliche Tau-Protein wird durch zahlreiche posttranslationale Modifikationen verändert. Neben der Ubiquitinierung, Polyaminierung, Nitrierung, Acetylierung, Methylierung, Proteolyse und Glykosylierung von Tau spielt insbesondere die Phosphorylierung eine entscheidende Rolle in der Modulation der Proteinfunktion (Beharry et al., 2014; Pevalova et al., 2006).

Tau ist ein Phosphoprotein, das zwei bis drei Mol Phosphat pro Mol Tau enthält (Kopke et al., 1993). Die längste Tau-Isoform besitzt 80 Serin(Ser)- und Threonin(Thr)-Reste und fünf Tyrosin(Tyr)-Reste, die potentielle Phosphat-Akzeptorstellen darstellen (Stoothoff und Johnson, 2005). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Tau an etwa 30 dieser Aminosäure(AS)-Reste phosphoryliert ist. Mit Ausnahme von sechs Ser-Resten, die im Bereich der MT-bindenden Einheiten (R1-R4 und Zwischensequenzen) liegen, befindet sich der Großteil dieser Phosphorylierungsstellen außerhalb der MT-bindenden Domäne (Buee et al., 2000). Die Phosphorylierung dieser AS-Reste beeinflusst entscheidend die Funktion des Tau-Proteins, da sie die Bindungsaffinität gegenüber den MT reduziert und somit zu einer Destabilisierung des MT-Netzwerks beiträgt (Drechsel et al., 1992). So wirkt dephosphoryliertes Tau als wesentlich stärkerer Promotor der MT-Polymerisation als phosphoryliertes Tau (Lindwall und Cole, 1984).

Ähnlich wie die Expression der Isoformen variiert auch der Phosphorylierungszustand des Tau-Proteins im Verlauf der Hirnentwicklung. Während fetales Tau sehr stark phosphoryliert ist, kommt es etwa zeitgleich mit dem Auftreten der adulten Tau-Isoformen in der frühen postnatalen Periode zu einer Dephosphorylierung zahlreicher AS-Reste, die im adulten ZNS bestehen bleibt (Goedert et al., 1993). Dies ist vermutlich auf die vermehrte Aktivierung von Tau-Phosphatasen im adulten ZNS zurückzuführen (Mawal-Dewan et al., 1994).

1.1.3.1 Tau-Kinasen

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung, welches die Bindung von Tau an die Mikrotubuli und seine Interaktion mit weiteren Proteinen reguliert (Stoothoff und Johnson, 2005). Um dieses Gleichgewicht aus MT-gebundenem und freiem Tau zu erhalten, bedarf es der Aktivität spezifischer Enzyme aus der Gruppe der Proteinkinasen und -phosphatasen. Es existieren über 20 Proteinkinasen, die via Phosphorylierung an der Regulation der Tau-Funktion beteiligt sind

und in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden können (Buee et al., 2010). Die meisten an der Tau-Phosphorylierung beteiligten Kinasen gehören zur Gruppe der Prolin-gerichteten Proteinkinasen (PDPKs, siehe Tab. 1), das heißt sie phosphorylieren Ser- und Thr-Reste auf die unmittelbar ein Prolin folgt (Buee et al., 2000; Pevalova et al., 2006). Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK), die der Familie der MAP-Kinasen zuzuordnen sind und durch zellulären Stress (chemisch, Hitze, osmotischer Schock, UV-Licht, Proteinsynthese-Inhibitoren), bakterielle Lipopolysaccharide und proinflammatorische Zytokine aktiviert werden (Goedert et al., 1997).

Eine besondere Bedeutung unter den Kinasen kommt der GSK-3 β zu, da sie *in vitro* in der Lage ist etwa 40 verschiedene Ser/Thr-Bindungsstellen des Tau-Proteins zu phosphorylieren (Beharry et al., 2014). Die Koexpression von Tau und GSK-3 β in nicht-neuronalen Zellen führt zur Hyperphosphorylierung von Tau und dem Verlust der MT-Bindung und daraus folgender Destabilisierung der MT (Lovestone et al., 1996). Die GSK-3 β -vermittelte Phosphorylierung wird noch gesteigert, wenn Tau zuvor durch die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) oder auch verschiedene andere non-PDPKs phosphoryliert wurde (Sengupta et al., 1997). Die Cdk5 trägt ebenso wie die GSK-3 β zur Phosphorylierung zahlreicher Ser- und Thr-Reste des Taumoleküls bei. In postmitotischen Neuronen wird Cdk5 durch Interaktion mit ihren Regulatorproteinen (p35, p25 und p39) aktiviert und ist am Aufbau des Zytoskeletts und dessen Organisation während des axonalen Wachstums beteiligt (Maccioni et al., 2001).

Eine Übersicht über die Gruppen der Tau-Kinasen und einige Beispiele gibt Tabelle 1. Für viele der Tau-Kinasen konnte die Tau-Phosphorylierung bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden, während über deren Funktion und Zusammenspiel *in vivo* noch wenig bekannt ist.

Tau-Kinasen

I) Prolin-gerichtete Proteinkinasen (PDPKs):

- Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) , darunter Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK)
- Cyclin-abhängige Kinasen (cdk5, cdk2)

II) Nicht-Prolin-gerichtete Proteinkinasen (non-PDPKs):

- Proteinkinase A, B und C
- Kasein-Kinase 1 und 2 (CK-1, CK-2)
- Tau-Tubulin-Kinase 1 und 2
- DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A)
- Phosphorylase-Kinase
- Rho-Kinase
- PKN (Proteinkinase novel)

III) Serin/Threonin-Proteinkinasen (unabhängig von einem folgenden Prolin-Rest)

- GSK-3 α und -3 β
- AGC Kinasen (u.a. MSK I)

IV) Tyrosin-Proteinkinasen:

- Src-Kinasen
- c-Abl
- c-Met

Tab. 1 Übersicht über einige an der Tau-Phosphorylierung beteiligte Kinasen. Die Einteilung in vier Hauptgruppen erfolgte entsprechend Buee et al., 2010.

1.1.3.2 Tau-Phosphatasen

Als Gegenspieler zu den Tau-Kinasen agieren eine Reihe von Proteinphosphatasen, die durch Dephosphorylierung die MT-Bindungsaffinität des Tau-Proteins erhöhen können. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass drei Proteinphosphatasen (PP) -PP1, PP2A und PP2B

(Calcineurin)- in der Lage sind Tau zu dephosphorylieren. Auch PP5, eine erst später identifizierte Proteinphosphatase, ist *in vitro* und in Zellkultur an der Dephosphorylierung von Tau beteiligt (Gong et al., 2004). Sie alle sind direkt oder indirekt über die Bindung an Tau mit den MT assoziiert (Buee et al., 2000). Unter den genannten ist PP2A die am besten untersuchte Phosphatase mit der vermutlich größten Relevanz für die Regulation der Tau-Phosphorylierung. Ihre Fähigkeit pathologisch hyperphosphoryliertes Tau zu dephosphorylieren ist stärker ausgeprägt als bei PP1 oder PP2B (Wang et al., 1996). Die Inhibition von PP2A führt in Zellkultur und auch im Tierversuch zur Hyperphosphorylierung von Tau, begleitet von einer Abnahme der MT-Bindung und Zerstörung stabiler MT. Die vermehrte Tau-Phosphorylierung ist dabei nicht nur durch die fehlende Dephosphorylierung sondern auch durch die vermehrte Aktivierung von Tau-Kinasen (MAPK, Cdk2, Cdk5) bedingt (Bennecib et al., 2001; Tanaka et al., 1998). Während PP2A normalerweise die Kinaseaktivität der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKII) durch Inhibition der Autophosphorylierung herunter reguliert, führt die Abnahme der PP2A-Aktivität zur Hochregulation der Kinaseaktivität und damit gesteigerter Tau-Phosphorylierung und Aggregation (Bennecib et al., 2001). Im Gehirn von Alzheimer-Patienten konnte eine signifikant erniedrigte Aktivität von PP2A im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Gong et al., 1993). Insgesamt ist ein physiologisches Gleichgewicht zwischen Tau-Kinasen und -Phosphatasen essentiell für die Regulation der Taufunktion und den Erhalt eines stabilen MT-Netzwerks.

1.1.4 Weitere posttranslationale Modifikationen des Tau-Proteins

Der Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins wird zudem durch andere posttranslationale Modifikationen beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass durch aberrante Glykosylierung die Phosphorylierung von Tau gefördert und die Dephosphorylierung inhibiert wird. Studien an Gehirnen von Alzheimer-Patienten geben Hinweise darauf, dass die Glykosylierung möglicherweise der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins vorausgeht und somit die pathologische Hyperphosphorylierung von Tau erleichtert. Der Effekt der Glykosylierung auf die nachfolgende Phosphorylierung variiert dabei in Abhängigkeit von der betroffenen Phosphorylierungsstelle des Tau-Proteins (Gong et al., 2005).

In vitro-Studien zeigen, dass durch Nitrierung von Tyrosinresten des Tau-Proteins ebenso wie durch die Hyperphosphorylierung die MT-Bindungsaffinität reduziert und die Integrität des

Zytoskeletts gestört wird (Zhang et al., 2005).

Andere Modifikationen, wie die Glykierung und Ubiquitinilierung, werden nur an pathologischen Tauaggregaten nicht jedoch an normalem Tau vorgenommen (Pevalova et al., 2006). Die Ubiquitinilierung von Proteinen dient deren Abbau durch das Proteasom. Dessen Funktion scheint jedoch bei bestimmten neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Erkrankung, gestört zu sein. Dann führt die Ubiquitinilierung von Proteinaggregaten nicht zum gewünschten proteasomalen Abbau, sondern zur Ablagerung der Aggregate in der Zelle (Keller et al., 2000).

1.1.5 Pathologische Aggregation des Tau-Proteins

Die pathologische Aggregation der Tau-Isoformen in Form von intraneuronalen Einschlüssen, sowie die damit einhergehende Degeneration der betroffenen Hirnregionen, sind das charakteristische neuropathologische Kennzeichen zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen, die man daher als Tauopathien bezeichnet (Lee et al., 2001).

Unter pathologischen Bedingungen ist das Äquilibrium der Taubindung an die MT gestört. Es kommt zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit von Tau an die MT, an der verschiedene auslösende Faktoren (u.a. vermehrte Phosphorylierung und/oder verminderte Dephosphorylierung) beteiligt sind. In der Folge erhöht sich die Konzentration an ungebundenem Tau im Zytosol, wodurch die Fehlfaltung und damit die Aggregation der Tau-Proteine begünstigt werden (Ballatore et al., 2007). Die Bedeutung der Phosphorylierung liegt dabei nicht nur in der Störung des Tau-MT-Äquilibriums, sondern auch in der direkten Beeinflussung der Tau-Aggregation. So erleichtert die Phosphorylierung die Interaktion und Zusammenlagerung von phosphoryliertem mit nicht-phosphoryliertem Tau (Alonso et al., 1996).

Durch Veränderung der Tau-Konformation und Aggregation mehrerer hyperphosphorylierter und durch Proteolyse verkürzter Tauproteine entstehen zunächst nicht-fibrilläre Ablagerungen aus granulären Tau-Oligomeren, die auch *Pretangles* genannt werden. Die immunhistochemische Darstellung der *Pretangles* ergibt ein granuläres zytoplasmatisches Färbemuster und ist durch das Fehlen von β -Faltblattstrukturen gekennzeichnet (Galvan et al., 2001; Maeda et al., 2007). Die Aggregate befinden sich entweder frei im Zytoplasma oder sind an membranöse Zellorganellen gebunden (Mena et al., 1996). In einem weiteren Schritt kommt es zur Ausbildung der charakteristischen β -Faltblattstruktur des Tau-Proteins, welche

immunhistochemisch durch Färbung mit Thioflavin S oder Thiazinrot nachweisbar ist (Kuret et al., 2005b). Da diese Veränderungen der Konformation insbesondere an Membran-gebundenem Tau zu beobachten sind, geht man davon aus, dass durch Interaktion mit intrazellulären Membranen und Organellen die Fehlfaltung und Aggregation des Proteins begünstigt werden (Galvan et al., 2001; Kuret et al., 2005b; Mena et al., 1996). Dafür sprechen auch Biopsiebefunde von Alzheimer-Patienten, in denen eine Assoziation der pathologischen Tau-Aggregate mit der Oberfläche von Zellmembranen beobachtet werden konnte (Gray et al., 1987). In einem weiteren Schritt kommt es zur Polymerisation der fehlgefalteten Tau-Proteine zu Filamenten und zur Entstehung intrazellulärer fibrillärer Cluster, die als neurofibrilläre *Tangles* (NFTs) bezeichnet werden (Galvan et al., 2001).

In vitro-Studien zeigen, dass der Prozess der Tau-Polymerisation durch eine Kinetik der Keimbildung beschrieben werden kann. Nach der Verzögerungsphase (Keimbildung) kommt es zu einem exponentiellen Wachstum der Filamente bis ein Gleichgewichtszustand aus Polymerisation und Depolymerisation erreicht ist, in dem kein weiteres Wachstum stattfindet. Die so entstehenden Tau-Filamente sind etwa 300 bis 600 nm lang (Chirita und Kuret, 2004) und treten in zwei verschiedenen Formen in Erscheinung. Während einige neurofibrilläre Ablagerungen überwiegend aus geraden Filamenten (*straight filaments*, SFs) bestehen, dominieren bei anderen Ablagerungen umeinander gewundene Filamente (*paired helical filaments*, PHFs). Aufgrund der helikalen Windungen der parallel verlaufenden Filamente besitzen die PHFs eine Breite von 8 bis 20 nm, die mit einer Periodizität von etwa 80 nm variiert (Ksiezak-Reding und Wall, 1994). Die SFs hingegen besitzen keine helikalen Windungen und sind etwa 10 bis 15 nm breit. Strukturell gesehen sind PHFs und SFs sehr ähnlich, da sie je aus zwei Hemifilamenten bestehen, die sich aus identisch geformten Untereinheiten zusammensetzen. Die beiden Filament-Arten unterscheiden sich lediglich in der Anordnung der Untereinheiten (Crowther, 1991). Die Sekundärstruktur der Filamente entspricht einer β -Faltblattstruktur, die man charakteristischerweise auch bei anderen intra- und extrazellulären Amyloid-Ablagerungen findet (Berriman et al., 2003). Die β -Faltblattstruktur der PHFs wird durch 93 bis 95 Aminosäuren lange Sequenzen vermittelt, die das Protease-resistente Kern-Peptid der Filamente bilden und bei denen es sich um die MT-bindenden Einheiten des Tau-Proteins handelt (Berriman et al., 2003; Novak et al., 1993). Ob PHFs oder SFs ausgebildet werden, ist abhängig von den Tau-Isoformen, die diese bilden. So bilden 3R-Isoformen die PHFs während aus den 4R-Isoformen SFs entstehen (Goedert et al.,

1996). Im Gegensatz zu SFs sind die PHFs besonders zahlreich in späten Erkrankungsstadien zu finden und nehmen durch ihre helikale Anordnung eine energetisch günstige Konformation ein (Kuret et al., 2005a). Die PHFs und/oder SFs lagern sich zusammen und bilden den Hauptbestandteil der NFTs.

In dem Versuch der Zelle die so entstandenen neurofibrillären Ablagerungen abzubauen, erfahren die NFTs zahlreiche Modifikationen. Dazu gehören die Ubiquitinilierung und der partielle proteolytische Abbau der PHFs (Verlust der aus N- und C-Termini des Tau-Proteins bestehenden Protease-sensiblen PHF-Hülle, auch *fuzzy coat*) (Bondareff et al., 1990). Zudem treten weitere Konformationsänderungen (Garcia-Sierra et al., 2003) und kovalente Kreuzverknüpfungen zwischen den Peptiden auf und die Aggregate werden zunehmend unlöslich (Iqbal et al., 1984). Dazu trägt auch die Hyperphosphorylierung der Aggregate bei, denn PHF-Tau enthält etwa 3 bis 4 Mal mehr Phosphat als normales Tau (6 bis 8 Mol Phosphat pro Mol Protein; (Ksiezak-Reding et al., 1992)), wodurch die Stabilität der Filamente begünstigt wird (Kuret et al., 2005a).

In vitro- und *in vivo*-Studien konnten zeigen, dass Tau-Aggregate unmittelbar zytotoxisch wirken (Khlistunova et al., 2006; Mocanu et al., 2008). Im Mausmodell geht die Ausbildung der Aggregate mit der Apoptoseinduktion via Caspase 3-Aktivierung einher (Messing et al., 2013). Mit dem neuronalen Zelltod und dem Zusammenbruch der Zellmembranen kommt es zum Auftreten partiell degradierter NFTs im Extrazellulärraum, die auch als *ghost tangles* bezeichnet werden (Bondareff et al., 1990; Galvan et al., 2001). Bei der Zelllyse werden jedoch nicht nur NFTs, sondern auch freie ungebundene Tau-Moleküle in den Extrazellulärraum freigesetzt. Studien an Zellkulturen zeigen, dass dieses freie Tau durch Veränderung der intrazellulären Calciumhomöostase einen toxischen Effekt auf die benachbarten Neurone besitzt und zu deren Zelltod führt (Gomez-Ramos et al., 2006).

1.2 Tauopathien

Die beschriebene intraneuronale Akkumulation von NFTs ist das charakteristische neuropathologische Merkmal der Tauopathien. Diese heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen umfasst über 20 verschiedene klinisch-pathologische Entitäten, deren bekanntester Vertreter die Alzheimer-Erkrankung ist. Die meisten der

Tauopathien äußern sich klinisch durch eine Kombination aus Demenz und Bewegungsstörungen. Trotz ihrer vielfältigen phänotypischen Erscheinungsformen und ihrer Unterschiede in Art und Verteilung der Tau-Aggregate sowie im Muster der Neurodegeneration, sind all diese Erkrankungen mit einer progressiven Akkumulation von filamentösen Tau-Einschlüssen assoziiert. Diese Tatsache spricht, ebenso wie die starken Überlappungen zwischen einigen Tauopathien, für einen gemeinsamen, mit einer Tau-Dysfunktion einhergehenden, pathologischen Prozess, der all diesen Erkrankungen zugrunde liegt und sich in vielfältigen klinisch-pathologischen Erscheinungsformen äußert (Bouchard und Suchowersky, 2011; Lee et al., 2001; Williams, 2006). Eine Übersicht über die Gruppe der Tauopathien liefert die folgende Tabelle:

Erkrankungen mit Tau-positiver neurofibrillärer Pathologie
Alzheimer-Krankheit
Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)/ Parkinsonismus-Demenz-Komplex (PDC)
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
Dementia pugilistica
Diffuse neurofibrilläre Tangles mit Kalzifikation
Down Syndrom
Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus assoziiert mit Chromosom 17 (FTDP-17)
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Krankheit
Hallervorden-Spatz-Krankheit
Kortikobasale Degeneration (CBD)
Myotone Dystrophie
Nicht-Guamische Motorneuronenerkrankung mit neurofibrillären Tangles
Niemann-Pick-Krankheit, Typ C (NPC)
Pick-Krankheit (PiD)
Postencephalitische Parkinsonismus (PEP)
Progressive subkortikale Gliose
Progressive supranukleäre Blickparese (PSP)
Prion-Protein cerebrale Amyloidangiopathie
Silberkornkrankheit
Subakut sklerosierende Panencephalitis (SSPE)
Tangle-only Dementia

Tab. 2 Übersicht der Tauopathien nach Lee et al., 2001

1.2.1 Neuropathologie

Während bei einem Großteil der Erkrankungen ausschließlich NFTs zu finden sind, zeigen einige Tauopathien weitere Proteinablagerungen, wie die durch Amyloid β -Ablagerungen entstehenden senilen Plaques, die bei der Alzheimer-Erkrankung, dem Down Syndrom und der Dementia pugilistica zu finden sind (Williams, 2006). Die Amyloid-Ablagerungen sind jedoch auch bei kognitiv unbeeinträchtigten Individuen zu finden und korrelieren im Gegensatz zu den NFTs nicht mit der Ausprägung einer Demenz (Arriagada et al., 1992). Neben den neuronalen Ablagerungen findet man in vielen Tauopathien auch Tau-positive, gliale Einschlüsse (*glial fibrillary tangles*) in Astrozyten und Oligodendrozyten (Chin und Goldman, 1996). Je nachdem in welchen Zellen die Tau-Aggregate vorkommen und welche Morphologie sie besitzen, werden sie unterschiedlich benannt. In Nervenzellkörpern und proximalen Dendriten bezeichnet man sie als NFTs, in den distalen Dendriten als *neuropil threads* und in Oligodendrozyten als *coiled bodies*. In Astrozyten unterscheidet man je nach Morphologie der Tau-Einschlüsse zwischen astrozytären *Plaques* (kurze Fortsätze mit feinen Kollateralen) oder *Tufts* (baumartige stumpf-endende Verzweigungen) (Komori et al., 1998).

1.2.2 Biochemisches Profil

Während in einigen Tauopathien (AD, spezielle FTDP-17-Mutationen) alle sechs Isoformen in den Tau-Aggregaten zu finden sind, zeigen andere eine selektive Aggregation von 3R- oder 4R- Isoformen. So aggregieren bei der CBD und der PSP lediglich 4R-Isoformen, im Gegensatz zur PiD, wo die Tau-Filamente aus 3R-Isoformen bestehen. Liegen der Tauopathie Genmutationen zu Grunde, die das alternative Spleißen beeinflussen, kommt es zudem zu einem generellen Ungleichgewicht des 3R-/4R-Tau-Verhältnisses im Gehirn. Dies ist der Fall bei bestimmten Mutationen, die das alternative Spleißen von Exon 10 zu Gunsten einer vermehrten oder verminderten Expression von 4R-Tau beeinflussen. Ein solches Ungleichgewicht in der Expression der Isoformen scheint ebenso wie die Art der befallenen Neurone relevant für die Entwicklung einer spezifischen Form der Tauopathie (Hernandez und Avila, 2007; Lee et al., 2001).

Diese Unterschiede zwischen den einzelnen Tauopathien lassen sich durch Western Blot-Analyse veranschaulichen. Je nachdem aus welchen Isoformen sich die NFTs zusammensetzen, ergibt sich ein für die jeweilige Tauopathie typisches Bänderungsmuster (siehe auch Abb.3). Sind 3R- und 4R-Isoformen an der Bildung der Aggregate beteiligt,

resultiert die elektrophoretische Auftrennung der unlöslichen Tau-Filamente in drei starken Banden bei 60, 64 und 68 kDa und einer schwächeren Bande bei 72 kDa. Dabei entsteht das 60 kDa-Tau durch Phosphorylierung der kürzesten Tau-Isoform (3R/0N), während die Phosphorylierung von Isoformen, die durch die Insertion von ein (3R/1N; 4R/0N) bzw. zwei (3R/2N; 4R/1N) weiteren Exons entstehen, die 64 kDa- bzw. 68 kDa-Bande erklärt. Das 72 kDa-Tau hingegen resultiert aus der Phosphorylierung der längsten Tau-Isoform (4R/2N). Durch Dephosphorylierung erhält man, wie auch bei der Auftrennung von löslichem Tau, sechs Banden entsprechend der sechs Tau-Isoformen. Handelt es sich um Tauopathien, bei denen es zu einer selektiven Aggregation von 3R- bzw. 4R-Isoformen kommt, sind entsprechend nur drei der vier (phosphoryliertes Tau) bzw. sechs (dephosphoryliertes Tau) Banden vorhanden (Lee et al., 2001).

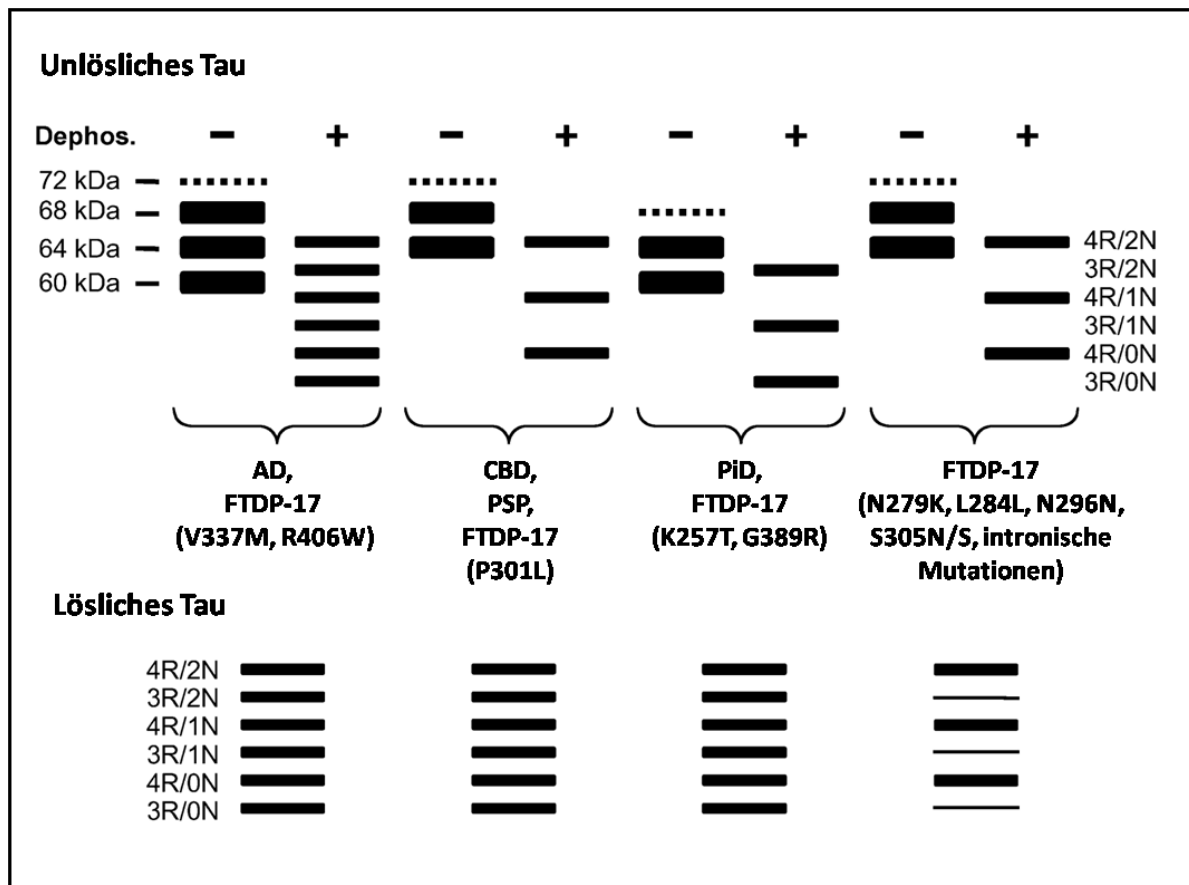


Abb. 3 Schematische Darstellung der Western Blot-Bänderungsmuster verschiedener Tauopathien (nach Lee et al., 2001)
Unlösliche Tau-Filamente und lösliches Tau aus dem Gehirn von Patienten mit verschiedenen Tauopathien bilden nach ihrer Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese und Färbung mit Anti-Tau-Antikörpern ein typisches Bänderungsmuster, das in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Gen-Mutation bzw. der an der Aggregatbildung beteiligten Isoformen variiert.

1.2.3 Klinisch-neuropathologische Merkmale häufiger Tauopathien

Klinisch äußern sich die meisten Tauopathien durch das Auftreten einer Demenz, oft in Kombination mit extrapyramidalmotorischen Bewegungsstörungen. Da die einzelnen Erkrankungen bezüglich ihrer klinischen und neuropathologischen Merkmale starke Überlappungen aufweisen, ist die Diagnosestellung häufig erschwert.

1.2.3.1 Alzheimer-Erkrankung

Die durch Alois Alzheimer 1907 erstmals beschriebene Alzheimer-Demenz (AD) ist die häufigste und am besten untersuchte unter den Tauopathien. Sie macht etwa 50-80% aller Demenzen aus und ist damit deren häufigste Ursache (Williams, 2006). Die Erkrankung äußert sich durch einen progredienten Verlust des Gedächtnisses und der kognitiven Funktionen bei Erhalt des Bewusstseins. Klinische Diagnosekriterien verlangen neben dem Vorliegen einer Demenz und einer Gedächtnisstörung den Nachweis von Defiziten in mindestens zwei kognitiven Bereichen (Gedächtnis, Sprache, Aufmerksamkeit, visuell-räumliche und exekutive Funktionen, Praxis) (McKhann et al., 1984). Neuropathologisch ist die Erkrankung durch das Auftreten von NFTs und extrazellulären senilen Plaques (β -Amyloid-Ablagerungen) gekennzeichnet, welche bereits vor dem Auftreten der klinischen Symptome nachweisbar sind (Braak und Braak, 1991). Die NFTs treten zunächst in nicht-thalamischen Nervenkerne des Hirnstamms auf (Locus coeruleus, dorsaler Raphe-Kern). Von dort aus breitet sich der pathologische Prozess systematisch auf höher gelegene kortikale Areale aus (Braak und Del Tredici, 2011). Die NFTs der AD bestehen aus pathologischen Aggregaten aller sechs Tau-Isoformen, deren physiologisches Expressionsmuster unverändert ist. Im Western Blot ergibt sich daher eine charakteristische Bänderung mit drei starken Banden bei 68, 64 und 60 kDa und einer schwächeren Bande bei 72 kDa (Buee et al., 2000; Lee et al., 2001).

1.2.3.2 Progressive supranukleäre Blickparese

Eine weitere ebenfalls häufige Form der Tauopathie ist die progressive supranukleäre Blickparese (PSP), die mit einer Prävalenz von 6,4/100.000 die zweithäufigste Form von Parkinsonismus nach dem idiopathischen Parkinsonsyndrom darstellt (Schrag et al., 1999). Die klinischen Merkmale der Erkrankung wurden erstmals 1964 durch Steele, Richardson und Olszewski beschrieben und sind durch das Auftreten von supranukleärer Blickparese, Pseudobulbärparalyse, nuchaler Dystonie und Demenz gekennzeichnet (Steele et al., 1964).

Entsprechend der NINDS-SPSP-(National Institute of Neurological Disorders and Stroke Society for Progressive Supranuclear Palsy) Kriterien sind die wichtigsten klinischen Merkmale die ausgeprägte posturale Instabilität, die innerhalb des ersten Jahres nach Erkrankungsbeginn zu Stürzen führt, die vertikale supranukleäre Blickparese und der progressive Verlauf mit Erkrankungsbeginn ab dem 40. Lebensjahr oder später (Litvan et al., 1996a). Die definitive Diagnose erfordert jedoch den neuropathologischen Nachweis typischer Veränderungen. Dazu gehören Tau-positive neuronale (NFTs und *neuropil threads*) und gliale (*tufted astrocytes*, *coiled bodies*) Einschlüsse, welche besonders zahlreich in Pallidum, Nucleus subthalamicus, Substantia nigra und Hirnstamm, sowie in geringerer Dichte in anderen subkortikalen Arealen zu finden sind (Litvan et al., 1996b). Die Ablagerungen zeigen sich auch in kortikalen Arealen, wobei der primäre Motorcortex besonders betroffen ist und die bei der AD betroffenen assoziativen Areale eher ausgespart bleiben (Hauw et al., 1990). Die neokortikale Beteiligung findet sich erst in späteren Erkrankungsstadien und ist mit dem Auftreten einer Demenz assoziiert (Buee et al., 2000). Auch das elektrophoretische Profil unterscheidet sich von der AD, da statt der dreibändigen Gliederung bei der PSP nur zwei Hauptbanden bei 64 und 68 kDa, sowie die schwächere Bande bei 74 kDa zu finden sind. Dies begründet sich darin, dass es bei der PSP zu einer selektiven Aggregation von 4R-Tau kommt, welches sich zu SFs zusammenlagert (Lee et al., 2001). Neben dieser typischen klinisch-pathologischen Erscheinungsform der PSP gibt es zahlreiche atypische Varianten. So äußern sich Unterschiede in der Schwere und der Verteilung der Tau-Pathologie in einer Vielfalt an klinischen Erscheinungsformen. Die der PSP eigene pathologische Heterogenität resultiert in zahlreichen Gemeinsamkeiten mit anderen Tauopathien, insbesondere mit der frontotemporalen Lobärdegeneration (FTLD) mit Tau-positiven Einschlüssen und der kortikobasalen Degeneration (CBD). Nur in einem Bruchteil der Fälle kommt es zum Auftreten einer typischen PSP. Die Koexistenz oder Überlappung mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen erschwert somit entscheidend die Diagnosestellung (Bouchard und Suchowersky, 2011; Keith-Rokosh und Ang, 2008).

1.2.3.3 Kortikobasale Degeneration

Eng mit der PSP verwandt ist die seltene und langsam progredient verlaufende CBD. Die Erkrankung wurde 1968 durch Rebeiz et al. beschrieben und ist klinisch durch eine Kombination aus extrapyramidalmotorischen Bewegungsstörungen und kognitiven Störungen gekennzeichnet (auch als *corticobasal syndrom* (CBS) bezeichnet). Die Beteiligung

der Basalganglien äußert sich in asymmetrischer Akinese und Rigidität, Dystonie, Myoklonus und Tremor. Zu den kortikalen Symptomen gehören Aphasie, ideomotorische Apraxie und kortikaler sensorischer Verlust, der mit dem Auftreten eines *Alien limb*-Phänomens einhergehen kann. Eine Demenz ist bei 30-75% der Patienten bereits initial zu finden. Die Frontalhirnschädigung zeigt sich zudem in Form von kognitiven Funktionsstörungen und Persönlichkeitsveränderungen (Bouchard und Suchowersky, 2011; Williams, 2006). Die Sensitivität und Spezifität der klinischen Merkmale eines CBS für die Diagnosestellung einer CBD sind jedoch gering. So zeigen nur etwa 50% der durch Autopsie gesicherten Fälle einer CBD auch ein CBS. Zahlreiche andere neurodegenerative Erkrankungen, wie AD, PSP und FTLD, können sich ebenfalls durch ein CBS äußern und damit eine CBD imitieren (Kouri et al., 2011).

Makroskopisch ist die CBD durch eine asymmetrische fronto-parietale Atrophie gekennzeichnet, die besonders ausgeprägt in den parasagittalen Regionen zu finden ist. Histologisch zeigen sich neuronale Degeneration und Gliose in den betroffenen kortikalen Regionen (Substantia nigra, Globus pallidus, Neostriatum und Nucleus subthalamicus). Ein besonderes histologisches Merkmal ist das Vorhandensein kortikaler ballonierter Neurone. Tau-positive Einschlüsse finden sich in Neuronen und Gliazellen der grauen und weißen Substanz. Es zeigen sich kleine, an *Pick bodies* erinnernde NFTs, *coiled bodies*, *neuropil threads*, sowie die als histologisches Kennzeichen der CBD geltenden *astrozytären Plaques*. Die Abgrenzung letzterer von den bei der PSP vorkommenden *astrozytären Tufts* hilft bei der histopathologischen Unterscheidung der beiden Erkrankungen (Wakabayashi und Takahashi, 2004).

Ebenso wie bei der PSP handelt es sich bei der CBD um eine 4R-Tauopathie mit einem charakteristischen zweibändigen (Tau 64, 68) elektrophoretischen Profil (Buee et al., 2000). Unterschiede im biochemischen Profil der beiden Erkrankungen entstehen jedoch durch die unterschiedliche N-terminale Spaltung von unlöslichem Tau zu Fragmenten mit geringerem Molekulargewicht, die in der Elektrophorese zusätzlich zu den beiden Hauptbanden als schwächere Bänderung im niedermolekularen Bereich sichtbar sind. Während sich bei der CBD eine Doppelbänderung bei 37 kDa zeigt, bilden die Fragmente bei der PSP eine einzelne Bande bei 33 kDa. Diese unterschiedliche Prozessierung von pathologisch verändertem Tau dient einigen Autoren als Erklärung für die unterschiedlichen neuropathologischen Merkmale der beiden Erkrankungen (Arai et al., 2004).

1.2.3.4 Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosoms 17

Die Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17) umfasst eine heterogene Gruppe hereditärer neurodegenerativer Erkrankungen, die gemeinsame klinische, pathologische und genetische Merkmale besitzen (Bouchard und Suchowersky, 2011). Wilhelmssen et al. beschrieben die Erkrankung 1994 als *Disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex* (DDPAC) und konnten erstmals durch Kopplungsanalyse den genetischen Ursprung der Erkrankung auf Chromosom 17q21 lokalisieren (Wilhelmssen et al., 1994). In der Folge wurden zahlreiche weitere Formen von frontotemporaler Demenz beobachtet, die ebenfalls durch Mutationen im Tau-Gen auf Chromosom 17 hervorgerufen werden und sich in einer Vielzahl phänotypischer Erscheinungsformen äußern.

Die klinischen Symptome beinhalten Störungen von Verhalten, Kognition und Motorik. Zu den frühen klinischen Symptomen gehören Persönlichkeits- und Verhaltensveränderungen, wie soziale Disinhibition, gestörte Impulskontrolle, Apathie, Aggressivität und Hyperoralität. Kognitive Störungen beinhalten das Auftreten von Sprachstörungen bis hin zum Mutismus, Störungen der exekutiven Funktionen und die Entwicklung einer Demenz (Foster et al., 1997). Motorisch manifestiert sich die Erkrankung durch einen variabel ausgeprägten Parkinsonismus, der sich in Form eines Dopa-resistenten Parkinsonismus (mit und ohne Tremor), aber auch als CBS oder PSP-ähnliches Syndrom äußern kann. Dies erklärt die häufigen Verwechslungen mit anderen Tauopathien, wie der CBD oder PSP (Bouchard und Suchowersky, 2011).

Auch die neuropathologischen Merkmale, wie die Verteilung und die Art der Tau-Ablagerungen ähneln denen einer PSP, CBD oder PiD. Makroskopisch findet man neben einer frontotemporalen Atrophie, eine Atrophie der Basalganglien und eine Depigmentierung der Substantia nigra. Mikroskopisch zeigen sich ein ausgeprägter neuronaler Zellverlust, eine Gliose der grauen und weißen Substanz sowie eine spongiöse Auflockerung der oberflächlichen kortikalen Laminae (Foster et al., 1997). NFTs finden sich in Neuronen und Gliazellen in Cortex, Cerebellum und Hirnstamm (Buee et al., 2000; Williams, 2006). Je nachdem welche Tau-Mutation der Erkrankung zugrunde liegt, werden die NFTs überwiegend durch 4R- oder 3R-Tau (und somit PHFs oder SFs) oder gleichermaßen durch beide Arten von Isoformen gebildet.

Bei den Tau-Mutationen handelt es sich entweder um Missense-Mutationen, Deletionen oder stille Mutationen im Bereich kodierender Regionen oder um Mutationen im Bereich

von Introns, die sich in der Nähe der 5'-Spleißstelle von E10 befinden. Die intronischen und einige der exonischen Mutationen (N279K, L284L, ΔN296, N296N, N296H, S305N und S305S) verändern das alternative Spleißen von Exon 10 durch Beeinflussung regulatorischer Elemente (*exon splicing enhancer* bzw. *silencer*, siehe auch Abschnitt 1.3.1.1.) und führen dadurch zu einer Überexpression der 4R-Isoform (Goedert und Jakes, 2005). In diesem Fall kommt es zu einer selektiven Aggregation von 4R-Tau und das biochemische Profil entspricht dem anderer 4R-Tauopathien, wie der PSP oder CBD. Im Gegensatz dazu wird das Expressionsmuster durch Mutationen in kodierenden Regionen außerhalb von Exon 10 nicht verschoben und betrifft alle Isoformen gleichermaßen. Bei einigen dieser Mutationen (V337M, R406W) entsprechen Morphologie und biochemische Charakteristika der Tau-Filamente denen der AD, bei der die NFTs durch alle sechs Isoformen gebildet werden. Andere Mutationen (K252T, G272V, E342V und G389R) wiederum führen zu einer selektiven Aggregation von 3R-Tau, wie sie auch bei der PiD zu finden ist (siehe auch Abb. 3) (Lee et al., 2001).

1.3 Ätiologie der Tauopathien

Epidemiologische, klinische und experimentelle Daten legen nahe, dass den Tauopathien ein sehr breites ätiologisches Spektrum zu Grunde liegt, das sich von rein genetischen Varianten bis hin zu durch Umweltfaktoren verursachten Erkrankungen erstreckt. Dazwischen liegt eine vermeintlich große Gruppe an sporadischen Tauopathien, deren Entstehung möglicherweise ein Zusammenwirken von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren erfordert.

1.3.1 Einfluss genetischer Faktoren

1.3.1.1 MAPT-Mutationen und deren funktionelle Auswirkungen

Die Bedeutung genetischer Einflüsse in der Entstehung der Tauopathien entdeckte man erstmals bei der Untersuchung seltener, familiärer Tauopathien, wie den autosomal-dominant vererbten Formen der FTDP-17. Die Entdeckung zahlreicher Tau-Mutationen in Patienten mit FTDP-17 bewies, dass eine gestörte Tau-Funktion unabhängig von anderen Faktoren ausreicht, um eine Tauopathie zu induzieren (Foster et al., 1997; Lee et al., 2001).

Bis heute wurden 44 verschiedene MAPT (*microtubule-associated protein tau*)-Mutationen identifiziert, die sich in klinisch und neuropathologisch vielgestaltigen FTDP-17-Phänotypen manifestieren (<http://www.molgen.ua.ac.be>). Diese Mutationen führen durch unterschiedliche Mechanismen zur Ausbildung einer Tau-Pathologie. Dabei bewirken die Mutationen entweder Veränderungen auf Ebene der prä-mRNA durch Beeinflussung des alternativen Spleißens oder ihr Effekt macht sich erst posttranslational bemerkbar. Zahlreiche Missense-Mutationen (P301L, V337M, R406W u.a.) beeinflussen die Funktionen des Tau-Proteins, indem sie -entsprechend ihrer Lage im Bereich der MT-bindenden Domäne- die Fähigkeit an MT zu binden herabsetzen und damit eine, im Vergleich zu Wildtyp-Tau, deutlich reduzierte Promotion der MT-Polymerisation bewirken (Hong et al., 1998). Dies zeigen auch die variabel ausgeprägte Abschwächung der MT-Bindung und die Desorganisation des MT-Netzwerks bei der Expression von mutiertem Tau in verschiedenen Zelllinien (Goedert und Jakes, 2005; Lee et al., 2001). Einige der Missense-Mutationen bewirken zudem eine FTDP-17-Pathologie indem sie die Tau-Aggregation fördern. So steigern in *in vitro*-Studien bestimmte Tau-Mutationen (R5L, K257T, I260V, G272V, ΔK280, P301L, P301S, Q336R, V337M und R406W) die Heparin- oder Arachidonsäure-induzierte Ausbildung von PHF-Tau im Vergleich zu Wildtyp-Tau. Während inhibitorische Domänen im Bereich der N- und C-Termini normalerweise die Tau-Aggregation verzögern, führt eine einzelne Punktmutation im Bereich der MT-bindenden Domäne zu einem pathologischen Funktionsgewinn des Taumoleküls in Form einer beschleunigten Aggregation (Barghorn et al., 2000; Goedert und Jakes, 2005). Dies zeigt sich besonders ausgeprägt für die Mutationen P301L und P301S und deutlich schwächer für R406W und weitere Mutationen (Goedert et al., 1999). Bei der Expression von FTDP-17 -Tau in humanen H4-Neurogliomzellen lässt sich dieser Effekt anhand der vermehrten Ausbildung von Tau-Filamenten bestätigen (DeTure et al., 2002). Weitere Mutationen (R406W, V337M, G272V, P301L) entfalten ihre neurotoxische Wirkung, indem sie die Phosphorylierung des Tau-Proteins und somit wiederum dessen Aggregation beeinflussen. So zeigen *in vitro*-Studien, dass FTDP-17-mutiertes Tau ein bevorzugtes Substrat für die Tau-Kinasen darstellt. Im Falle der R406W-Mutation läuft die *in vitro*-Phosphorylierung zwölf Mal so schnell und bis zu vier Mal stärker ab als die Phosphorylierung von nicht-mutiertem Tau. Das hyperphosphorylierte Tau ist in der Lage durch Komplexbildung mit normalem MT-gebundenem Tau die *in vitro*- Polymerisation von MT zu inhibieren und die Ausbildung von PHFs zu fördern. Dazu bedarf es im Falle von

mutiertem Tau eines wesentlich geringeren Zusatzes von Phosphat (4-6 Mol Phosphat/Mol Tau) im Vergleich zu Wildtyp-Tau (~10 Mol Phosphat/Mol Tau). So führen die Tau-Mutationen offenbar zu Konformationsänderungen des Proteins, die dessen Phosphorylierung und Polymerisation begünstigen (Alonso Adel et al., 2004). Dies bestätigen auch *in vivo*-Studien mit FTDP-17-transgenen Mäusen, in denen eine vermehrte Phosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins zu beobachten ist (Gotz et al., 2001; Tanemura et al., 2002; Tatebayashi et al., 2002). Gleichzeitig scheint die Hyperphosphorylierung von Tau durch eine mutationsbedingte Inhibition der Dephosphorylierung begünstigt zu werden. *In vitro*-Experimente zeigen, dass zahlreiche FTDP17-Mutationen die Bindungsfähigkeit von Tau an PP2A reduzieren und somit zur Tau-Hyperphosphorylierung und einer gestörten Tau-MT-Interaktion beitragen (Goedert et al., 2000).

Etwa die Hälfte der Taumutationen übt ihren primären Effekt auf RNA-Ebene aus. Bei der FTDP-17 spielt das alternative mRNA-Spleißen von Exon 10 und somit die Verschiebung des Verhältnisses von 3R- zu 4R-Tau eine besondere Rolle. Die Beeinflussung des alternativen Spleißens erfolgt über zahlreiche regulatorische Elemente, die sowohl innerhalb von Exon 10, als auch im darauf folgenden Intron zu finden sind. Bei diesen regulatorischen Elementen handelt es sich um verstärkende (*exon splicing enhancer*, ESE) und inhibitorische (*exon splicing silencer*, ESS) Sequenzen. Es wurden drei verschiedene cis-aktivierende regulatorische Elemente identifiziert. Dazu gehören ein ESE und ein ESS innerhalb von Exon 10. Durch Genmutation im Bereich des ESE kann dieses Element sowohl verstärkt (Mutation N279K), als auch zerstört (Mutation Δ 280K) werden, wodurch es zum konsekutiven In- bzw. Outsplicing von Exon 10 kommt. Ebenso führt eine stille Mutation (L284L) im Bereich des ESS zur vermehrten Transkription von E10 (D'Souza et al., 1999). Ein weiteres inhibitorisches Element liegt im Bereich der 5'-Spleißstelle von Exon 10. Hierbei handelt es sich um eine stabile Stamm-Schleifen-Struktur, die sechs Nukleotide im Bereich von Exon 10 sowie 19 Nukleotide des folgenden Introns umfasst (ein neun Basenpaare umfassender Stamm, der durch ein ungepaartes Adenin unterteilt ist, sowie eine apikale Schleifenstruktur aus sechs Basenpaaren) (Spillantini et al., 1998). Diese Struktur wirkt als ESS, indem sie den Zugang der am Spleißen von Exon 10 beteiligten Proteine (Ribonukleoprotein-Partikel (snRNPs) und Serin-Arginin-reiche (SR) Proteine) zur 5'-Spleißstelle verhindert (Goedert und Jakes, 2005; Hutton et al., 1998). Genmutationen im Bereich dieser inhibitorischen Stamm-Schleifen-

Struktur (sowohl im Bereich des Exons als auch des Introns) fördern somit durch deren Destabilisierung die Erkennung der 5'-Spleißstelle und somit die Integration von E 10 in die Tau-mRNA (Hutton et al., 1998). In der Folge wird das physiologische Gleichgewicht von 3R- zu 4R-Tau-Isoformen und damit die Tau-Funktion gestört.

1.3.1.2 Tau-Haplotypen

Bereits vor der Identifikation von Tau-Genmutationen wurde ein Gensequenzpolymorphismus identifiziert, der mit dem Auftreten einer Tau-Pathologie in Zusammenhang gebracht wird. So fanden Conrad et al. 1997 einen Dinukleotid-Repeat-Polymorphismus in einer kaukasischen Population, der mit dem Auftreten der PSP assoziiert ist. Dieser Polymorphismus liegt im Bereich des Introns zwischen Exon neun und zehn des Tau-Gens. Die Allele an diesem Genlocus umfassen 11 bis 15 Dinukleotidwiederholungen. Das A0-Allel mit 11 Dinukleotidwiederholungen tragen 95% der Patienten mit PSP und nur 57% der Personen in der Kontrollgruppe (Conrad et al., 1997; Delacourte und Buee, 2000; Goedert und Jakes, 2005). Somit findet sich bei PSP-Patienten eine Überrepräsentation des häufigsten Allels (A0) und Genotyps (A0/A0). Durch Gensequenzanalyse des Tau-Gens konnten zudem weitere Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) identifiziert werden, die in einem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*) zueinander vorliegen (entsprechend einer nicht zufälligen Assoziation von Allelen) und somit ebenso wie der Dinukleotid-Repeat-Polymorphismus in Form von zwei erweiterten Tau-Haplotypen (H1 und H2) vererbt werden. Für den Haplotyp H1 konnte ebenso wie für die Einzelallele eine signifikante Assoziation zur PSP nachgewiesen werden (Baker et al., 1999).

1.3.1.3 R406W-Mutation

Die R406W-Missense-Mutation in Exon 13 des Tau-Gens führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan an Position 406. Bei Familien mit hereditärer FTDP-17 ist der Nachweis einer R406W-Mutation mit einem späten Erkrankungsbeginn ($57,3 \pm 2,3$ Jahre), langem Krankheitsverlauf ($17 \pm 7,6$ Jahre) und früher Beeinträchtigung des Gedächtnisses und damit klinisch-phänotypischer Ähnlichkeit zur Alzheimer-Erkrankung assoziiert. Während Defizite der Gedächtnisleistung meist früh auftreten und vor allem das episodische Gedächtnis betreffen, kommt es meist erst im späteren Krankheitsverlauf zu FTD-typischen Symptomen wie Persönlichkeitsveränderungen und Störung der Sprachfähigkeit (Ostojic et al., 2004).

Die Erstbeschreibung einer Familie mit autosomal-dominant vererbter R406W-Mutation erfolgte in Nordamerika (Reed et al., 1997), später auch in den Niederlanden (van Swieten et al., 1999), Belgien (Rademakers et al., 2003), Schweden (Ostojic et al., 2004), Dänemark (Lindquist et al., 2008) und Japan (Ikeuchi et al., 2011; Ikeuchi et al., 2008). Sowohl zwischen den einzelnen Familien, als auch innerhalb einer Familie mit R406W-Mutation besteht eine große klinische und neuropathologische Heterogenität. Das Alter bei Erkrankungsbeginn liegt zwischen 46 und 68 Jahren (Ikeuchi et al., 2011). Während in den meisten untersuchten Familien die Beeinträchtigung des Gedächtnisses als Initialsymptom im Vordergrund steht und sich Persönlichkeitsveränderungen erst spät entwickeln, gibt es auch Fallbeschreibungen bei denen frühe Persönlichkeitsveränderungen oder gar psychiatrische Symptome bei Erkrankungsbeginn imponieren (Reed et al., 1997; Saito et al., 2002). Einhergehend mit dem frühen Gedächtnisverlust konnte in einigen der betroffenen Familien eine Atrophie des Temporallappens nachgewiesen werden. Neuropathologisch zeigen sich in den betroffenen Familien Unterschiede in der Ausprägung und Verteilung der NFTs (siehe Tab. 3).

Im Gegensatz zu einigen anderen Tau-Mutation (G272V, Δ K280, P301L) hat die R406W-Mutation kaum direkte Effekte auf die Tau-MT-Interaktion, sondern bewirkt primär eine Veränderung der Tau-Struktur (Bunker et al., 2006). Durch den Aminosäureaustausch an Position 406 des Taumoleküls wird eine Veränderung der Molekülstruktur hervorgerufen, die den Zugang von Kinasen und endogenen Proteasen verändert. *In vivo*-Studien zeigen, dass R406W-mutiertes Tau im Vergleich zu Wildtyp-Tau ein bevorzugtes Substrat für Tau-Kinasen darstellt und es zur Hyperphosphorylierung bestimmter Phosphorylierungsstellen (v.a. Ser-396, Ser-400, Thr-403 und Ser-404) kommt (Alonso Adel et al., 2004). Wie oben beschrieben fördert diese Hyperphosphorylierung die Aggregation der Tau-Moleküle zu NFTs und inhibiert durch Komplexbildung mit MT-gebundenem nicht-mutiertem Tau die MT-Polymerisation.

Die Expression von R406W-mutiertem humanem Tau in Mäusen führt zu einer neurodegenerativen Erkrankung, die klinisch und neuropathologisch der durch die R406W-Mutation hervorgerufenen FTDP-17 im Menschen ähnelt. In den Mäusen konnten im Alter von etwa 18 Monaten hyperphosphorylierte Tauablagerungen in Neuronen des Vorderhirns nachgewiesen werden. Ebenso wie im Menschen kommt es dabei zu einer simultanen Akkumulation von mutiertem und endogenem Wildtyp-Tau. Die Tau-Ablagerungen finden

sich vor allem im Bereich des Neocortex, des Hippocampus, des Bulbus olfactorius, des Striatums und des Thalamus. Diese neuropathologischen Veränderungen gehen klinisch mit einer Störung des assoziativen Gedächtnisses in den betroffenen Mäusen einher. Die Expression in Mäusen scheint daher geeignet um die Einflüsse der Genmutation auf die klinisch-neuropathologische Ausprägung der FTDP-17 zu untersuchen (Tatebayashi et al., 2002).

FTD-Familie	Erkrankungsbeginn in Jahren	Erkrankungsdauer in Jahren	Symptome	Hirnatrophie	NFT-Verteilung
Schwedische Familie (Ostojic et al., 2004)	58 (56-62)	5-16 (noch am Leben)	Initiale Gedächtnisstörung, späte Sprachstörung, Persönlichkeitsveränderung, Ruhelosigkeit	Nicht untersucht	Nicht untersucht
Niederländische Familie (van Swieten et al., 1999)	55 (45- 75)	26 (21-35)	Initiale Gedächtnisstörung, Persönlichkeitsveränderung, später Mutismus	Milde symmetrische Atrophie des Frontal- und Temporallappens	+++/- medialer Temporallappen, Hippocampus, enthorinaler Cortex, isothermale Cortices +/- Frontaler, temporal, parietaler und occipitaler Neocortex
Amerikanische Familie (Reed et al., 1997)	59,2 ± 5,5	12,7 ± 1,5	Initiale Gedächtnisstörung, fehlender Antrieb, Ruhelosigkeit, später Mutismus	Frontal- und vordere Temporallappenatrophie	+++/- Frontal- und Temporalcortex, Gyrus parahippocampalis
Japanische Familien (Ikeuchi et al., 2011)	54 ± 7	5- 17	Initiale Gedächtnisstörung, späte wenig ausgeprägte Persönlichkeitsveränderung, Disinhibition und Unruhe	Atrophie v.a. des medialen Temporallappen/ Hippocampus, milde kortikale Atrophie	Nicht untersucht
Belgische Familie (Rademakers et al., 2003)	58,7 ± 3,9	13,7 ± 4,7	Initiale Gedächtnisstörung, späte Verhaltens- und Sprachauffälligkeiten	Diffuse kortikale Atrophie	Nicht untersucht
Dänische Familie (Lindquist et al., 2008)	61 (52-65)	Nicht angegeben	Initiale Gedächtnisbeeinträchtigung, späte Frontalhirnsymptome	Bilaterale Temporallappenatrophie, kortikale u. zentrale Atrophie	+++/- Frontal-/Temporalcortex u. Hippocampus, Hirnstammkerne

Tab. 3 Merkmale verschiedener FTDP-17-Familien mit R406W-Mutation (abgewandelt und ergänzt entsprechend Ostojic et al, 2004)

1.3.2 Einfluss von Umweltfaktoren

1.3.2.1 Atypischer Parkinsonismus auf Guadeloupe

Entscheidende Hinweise auf die Bedeutung von Umweltfaktoren in der Genese der Tauopathien lieferten Berichte über die ungewöhnlich hohe Prävalenz der PSP und des atypischen Parkinsonismus auf der karibischen Insel Guadeloupe.

Im Gegensatz zu Europa und Nordamerika, wo das idiopathische Parkinson-Syndrom die häufigste Form von Parkinsonismus darstellt und in weniger als 4% der Fälle eine PSP und in etwa 20% der Fälle ein atypischer Parkinsonismus vorliegen, wurde bei Patienten auf Guadeloupe ein gehäuftes Auftreten von atypischem Parkinsonismus und PSP beobachtet (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999).

Während das idiopathische Parkinson-Syndrom durch die Symptome Bradykinese, Ruhetremor, Rigor und posturale Instabilität gekennzeichnet ist, weisen die atypischen Parkinson-Syndrome oder auch „Parkinson-Plus-Syndrome“ zusätzliche Erkrankungsmerkmale auf und sind durch das Nicht-Ansprechen auf Levodopa gekennzeichnet. Die Gruppe der atypischen Parkinson-Syndrome umfasst die Multisystematrophie (MSA), die Lewy-Körperchen-Demenz (DLB) und die Tauopathien PSP und CBD (siehe Abschnitte 1.2.3.2 und 1.2.3.3 der Einleitung) (Wenning et al., 2011).

Synucleinopathien	Tauopathien
Lewy-Körperchen-Demenz	Progressive supranukleäre Blickparese (PSP) Richardson-Syndrom PSP-Parkinsonismus Pure Akinese Corticobasales Syndrom
Multisystematrophie (MSA) Parkinson-Variante (MSA-P) Cerebelläre Variante (MSA-C)	Corticobasale Degeneration (CBD) Richardson-Syndrom Corticobasales Syndrom Frontotemporale Demenz Progressive nonfluente Aphasie

Tab. 4 Klassifikation der atypischen Parkinson-Syndrome entsprechend der vorliegenden Protein-Aggregate, abgewandelt nach Wenning et al., 2011

Zur abnormen Aggregation des Proteins α -Synuclein kommt es beim Morbus Parkinson, sowie der Lewy-Körperchen-Demenz und der MSA, die zu den atypischen Parkinson-Syndromen zählen. Zu diesen gehören auch die PSP und die CBD aus der Gruppe der Tauopathien, die sich durch eine Vielzahl klinischer Phänotypen manifestieren können (Einzug).

Die klinische Analyse von Patienten mit Parkinsonismus auf Guadeloupe ergab eine ungewöhnlich hohe Anzahl atypischer Erkrankungsfälle. So zeigte eine klinische Langzeitstudie, die zwischen 1996 und 2002 auf der Insel durchgeführt wurde, dass von 265 im Studienzeitraum untersuchten Patienten nur 66 (25%) an einem idiopathischen Parkinson-Syndrom litten. Demgegenüber hatten 199 (75%) der untersuchten Patienten ein atypisches Parkinson-Syndrom. Bei 99 (49,7%) der 199 Patienten konnte anhand von operationalisierten diagnostischen Kriterien eine PSP, DLB, MSA oder CBD diagnostiziert werden. Der größere Anteil von 100 Patienten (50,3%) erfüllte weder die bestehenden klinisch-diagnostischen Kriterien eines Parkinson-Syndroms noch der atypischen Parkinson-Syndrome und fiel daher in die Gruppe des unklassifizierbaren Parkinsonismus. Klinisch zeichnete sich dieser durch schlechtes Ansprechen auf Levodopa, ausgeprägte axiale Rigidität, relativ symmetrische Ausprägung der Parkinson-Symptome, frühe Dysarthrie und fronto-limbische kognitive Beeinträchtigung aus (Caparros-Lefebvre und Lees, 2005). Der Anteil von Patienten mit unklassifizierbarem Parkinsonismus auf Guadeloupe ist im Vergleich zu Westeuropa deutlich erhöht. Während auf Guadeloupe etwa ein Drittel der Patienten betroffen sind, gehören in Westeuropa nur etwa 4 bis 5 % der Parkinson-Patienten, die sich in neurologischen Zentren vorstellen, zur Gruppe des unklassifizierbaren Parkinsonismus (Katzenschlager et al., 2003).

Ähnliche Ergebnisse lieferte auch eine prospektive Querschnittsstudie, die von September 2003 bis September 2005 auf Guadeloupe durchgeführt wurde. Während bei nur 50 (31%) der 160 untersuchten Patienten ein idiopathisches Parkinson-Syndrom vorlag, konnte bei 104 der Patienten (63%) eine atypische Form von Parkinsonismus diagnostiziert werden. Dieser atypische Parkinsonismus umfasst im Wesentlichen zwei verschiedene klinische Erscheinungsformen von Parkinsonismus und Demenz, die sich klinisch durch das Vorhandensein oder Fehlen okulomotorischer Symptome unterscheiden. Bei etwa der Hälfte der Patienten (n=51) ist eine supranukleäre Blickparese zu finden, die in den seltensten Fällen die Kriterien einer klassischen PSP erfüllt (n=12), jedoch in Kombination mit Halluzinationen, Illusionen und/oder schwerer autonomer Dysfunktion auftritt und aufgrund der klinischen Ähnlichkeit zur PSP als Guadeloupe-PSP (Gd-PSP) bezeichnet wird. Die andere Hälfte der Patienten mit atypischem Parkinsonismus (n=50) ist durch die Kombination aus Levodopa-resistentem Parkinsonismus und Demenz bei Fehlen okulomotorischer Symptome charakterisiert und wird dementsprechend als Guadeloupe-Parkinson-Demenz-Komplex (Gd-

PDC) bezeichnet. Entscheidendes klinisches Unterscheidungskriterium zwischen Gd-PSP, Gd-PDC und dem idiopathischen Parkinson-Syndrom ist die Entwicklung einer Demenz. Während bei nur 10% der Patienten mit Parkinson-Syndrom eine Demenz zu beobachten war, hatten 92% der Patienten mit Gd-PSP und 100% der Patienten mit Gd-PDC eine Demenz. Bei dieser handelt es sich typischerweise um eine frontosubkortikale Form der Demenz mit Beeinträchtigung der exekutiven Funktionen, die im Gegensatz zum idiopathischen Parkinson-Syndrom bereits bei Erkrankungsbeginn zu finden ist. Bei den Formen von atypischem Parkinsonismus auf Guadeloupe scheint es sich somit um eine eigene Entität zu handeln, die sich von anderen bekannten Parkinson-Demenz-Syndromen (z.B. Alzheimer-Demenz mit Parkinsonismus, LBD, FTDP) unterscheidet (Lannuzel et al., 2007).

1.3.2.2 Histologisches und biochemisches Profil des atypischen Parkinsonismus auf Guadeloupe

Immunhistochemische Untersuchungen an Hirnschnitten dreier Patienten auf Guadeloupe, die klinisch die Diagnosekriterien einer PSP erfüllten, konnten die diffuse Akkumulation von Tauprotein in Neuronen (*neuropil threads*, *Pretangles* und NFTs) und Gliazellen (astrozytäre *Tufts*) nachweisen. Die pathologischen Aggregate waren im Bereich des Isocortex, der subkortikalen Hirnnervenkerne, der (para-)hippocampalen Region und des Hirnstamms zu finden und von Nervenzellverlust und Gliose begleitet. Die Visualisierung der pathologischen Taukomponenten im Western Blot zeigte zudem ein PSP-ähnliches Bänderungsmuster mit zwei Hauptbanden bei 64 und 69 kDa. Der auf Guadeloupe zu findende Parkinsonismus wurde somit als PSP-ähnliche Sonderform der Tauopathien beschrieben, die sich klinisch und neuropathologisch von den bisher bekannten Tauopathien unterscheidet (Caparros-Lefebvre et al., 2002).

Trotz des charakteristischen Western Blot-Profiles konnte in den untersuchten Gehirnen keine Überexpression der 4R-Isoformen nachgewiesen werden. Die Gensequenzanalyse zeigte zudem, dass in keinem der untersuchten Fälle eine Tau-Mutation nachweisbar war. Alle drei Patienten waren jedoch homozygot für den H1-Haplotyp, der als Risikofaktor für die Entstehung einer PSP und CBD gilt (Caparros-Lefebvre et al., 2002).

1.3.2.3 Ätiologie des atypischen Parkinsonismus auf Guadeloupe

Die hohe Prävalenz atypischer Parkinson-Syndrome in einer geographisch umschriebenen Region, deren Gesellschaft durch ethnische Heterogenität gekennzeichnet ist (von 422.000 Einwohnern auf Guadeloupe sind 20% afrikanischer oder gemischter Herkunft, 15% indianischer und 5% kaukasischer Herkunft), lässt auf die Bedeutung von Umweltfaktoren in der Genese der Erkrankung schließen (Caparros-Lefebvre und Lees, 2005; Caparros-Lefebvre et al., 2002).

So konnte eine Fall-Kontroll-Studie, die zwischen September 1996 und August 1998 auf Guadeloupe durchgeführt wurde, einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von atypischem Parkinsonismus und dem Konsum tropischer Früchte aus der Familie der Annonaceae (Annonengewächse) nachweisen. Der Konsum von Früchten und Tees aus den Blättern dieser Pflanzen ist in tropischen Regionen weit verbreitet. Als Bestandteil der traditionellen Medizin werden die pflanzlichen Tees aufgrund ihrer sedierenden, digestiven und aphrodisierenden Effekte angewandt. Die Fall-Kontroll-Studie von Caparros-Lefebvre et al. zeigte, dass Patienten mit atypischem Parkinsonismus und PSP im Vergleich zu Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom und Kontrollpatienten einen signifikant erhöhten Konsum von Früchten und Tees aus Pflanzen der Annonaceae-Familie (insbesondere der *Annona muricata*, auch Guanábana und im deutschen Stachelannone oder Sauersack genannt) aufweisen. Darüber hinaus konnte bei sechs der untersuchten Patienten (zwei mit PSP, vier mit atypischem Parkinsonismus) jüngeren Alters (<65 Jahre) eine Symptomregression beobachtet werden nachdem der Annonaceae-Konsum eingestellt wurde (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999). Auch die von 2003 bis 2005 durchgeführte klinische Studie von Lannuzel et al. zeigte, dass Patienten mit Gd-PSP und Gd-PDC im Vergleich zu Kontrollpatienten und Patienten mit IPS einen signifikant erhöhten Konsum von Produkten der *Annona muricata* (Früchte, Säfte und Tees) haben. Während 76% der Patienten mit Gd-PSP und 74% der Patienten mit Gd-PDC zu den starken Konsumenten (≥ 10 Früchte oder Tassen pro Tag über ein Jahr) gehörten, traf dies nur für 20% der Patienten mit IPS zu (Lannuzel et al., 2007).

1.3.2.4 Acetogenine

Ursächlich für die neurotoxische Wirkung der *Annona muricata* und ihrer Verwandten sind die in den Pflanzen enthaltenen Neurotoxine, die Acetogenine. Seit der Isolation des ersten Acetogenins Uvaricin aus *Uvaria acuminata* 1984, wurden etwa 350 weitere Acetogenine

beschrieben. Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Eigenschaften, unter anderem ihrer zytotoxischen, antitumoralen, antiparasitären, antimikrobiellen und immunsuppressiven Fähigkeiten, galt den Acetogeninen zunehmendes wissenschaftliches Interesse (Cavé et al., 1997; Zafra-Polo et al., 1996). Bei den Acetogeninen der Annonaceae handelt es sich um natürliche Polyketide, deren chemische Struktur durch eine lange Alkylkette gekennzeichnet ist. Diese wird durch ein bis drei mittelständige Tetrahydrofuraneinheiten und eine endständige ungesättigte γ -Laktoneinheit ergänzt (Cavé et al., 1997).

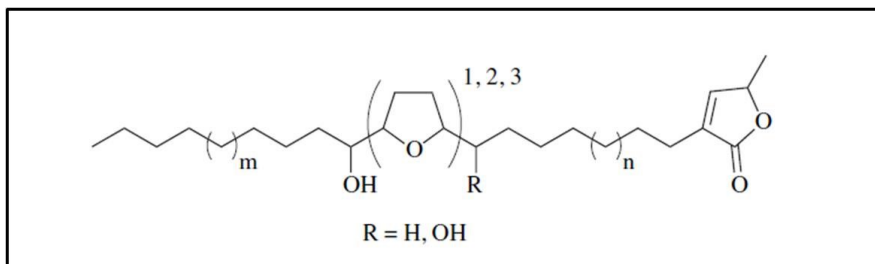


Abb. 4 Allgemeine Strukturmerkmale der Acetogenine (nach Cavé et al., 1997)

Die Acetogenine entfalten ihre toxische Wirkung indem sie als potente Inhibitoren des Komplex I der Atmungskette (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) fungieren und somit die Energiegewinnung der Zellen beeinflussen. Ihr zytotoxischer Wirkmechanismus entspricht der Wirkung von Rotenon und Piericidin, den prototypischen Komplex I-Inhibitoren. *In vitro* reichen bereits 30 nM des Acetogenins Annonacin aus, um eine 50%ige Reduktion der Komplex I-Aktivität hervorzurufen (Lannuzel et al., 2003).

Die lipophile Struktur der Acetogenine ermöglicht die Penetration der Zellmembran und der mitochondrialen Membranen durch passive Diffusion (Degli Esposti et al., 1994). Die starke Lipophilie und der fehlende aktive Auswärtstransport aus dem Gehirnparenchym durch P-Glykoproteintransporter in der Blut-Hirn-Schranke begünstigen die Akkumulation im lipidreichen Gehirn (Oberlies et al., 1997). Dass die Acetogenine in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke unbeschadet zu überwinden, zeigt der Nachweis von intaktem Annonacin im Hirnparenchym von Ratten, die mit Annonacin behandelt wurden (Champy et al., 2004).

Annonacin ist das Hauptacetogenin, das in der Rinde, den Wurzeln und Samen der *Annona muricata* zu finden ist. *In vitro*-Studien zeigen, dass Annonacin zum Zelltod kultivierter dopaminerger und nicht-dopaminerger Mittelhirnneurone der Ratte führt. Bei einer Inkubationszeit von vier Tagen reichen bereits Konzentrationen von 1 bis 3 nM Annonacin aus, um einen signifikanten Zellverlust hervorzurufen. Das neurotoxische Potential von

Annonacin ist dabei 50-fach stärker ausgeprägt als das des dopaminergen Neurotoxins MPP⁺ (1-Methyl-4-Phenylpyridinium) und etwa genauso stark wie das von Rotenon (Lannuzel et al., 2003). Neben den Acetogeninen enthält die *Annona muricata* als weiteren neurotoxischen Bestandteil Alkaloide. Dazu gehören die beiden Hauptalkaloide Coreximin und Reticulin, deren neurotoxische Wirkung zwar schwächer ausgeprägt ist, als die des Annonacins, die jedoch zur *in vivo*-Toxizität von Annonacin beitragen (Lannuzel et al., 2002). *In vivo* führte die chronisch-systemische Exposition von Ratten gegenüber Annonacin zu einem signifikanten Verlust dopaminergener Neurone in der Substantia nigra sowie GABAerger-Neurone im Striatum. Während der neuronale Verlust in den Basalganglien besonders ausgeprägt ist, sind Neocortex und Cerebellum nur mäßig betroffen. Dennoch konnte im Frontalkortex der mit Annonacin behandelten Ratten eine 44%ige Reduktion des ATP-Spiegels im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Neurodegeneration geht zudem mit einer ausgeprägten Astroglieose einher (Champy et al., 2004). Die Verteilung der neuronalen Läsionen in den behandelten Versuchstieren ähnelt dem Muster der Neurodegeneration, das in Patienten mit atypischem Parkinsonismus auf Guadeloupe beobachtet wurde (Caparros-Lefebvre et al., 2002; Champy et al., 2004). In Ratten reicht die intravenöse (i.v.) Infusion von 3,6 mg Annonacin/kg/d über 28 Tage (entsprechend 106 mg/kg) aus, um eine ausgeprägte Neurodegeneration hervorzurufen (Champy et al., 2004). In einer Frucht der *Annona muricata* sind etwa 15 mg Annonacin enthalten. Um im Menschen eine kumulative Jahresdosis von Annonacin zu erreichen, die der im Tierversuch entspricht, müsste ein durchschnittlicher Erwachsener (70 kg) schätzungsweise eine Frucht oder eine Kanne (à 330 ml) Nektar pro Tag über ein Jahr (kumulative Jahresdosis: 78 mg/kg (Frucht) bzw. 188 mg/kg (Nektar)) konsumieren (Champy et al., 2005). Lannuzel et al. zeigten, dass bei den Patienten mit atypischem Parkinsonismus auf Guadeloupe die kumulative Gesamtdosis an Annonacin eines durchschnittlichen Erwachsenen (70 kg) über die Lebenszeit bei $2 \pm 0,6$ g/kg bei Patienten mit Gd-PSP und $2,2 \pm 0,7$ g/kg bei Patienten mit Gd-PDC liegt. Im Vergleich dazu konsumierten Patienten mit idiopathischem Parkinsonsyndrom nur $0,3 \pm 0,1$ g/kg Annonacin und Patienten in der Kontrollgruppe $0,5 \pm 0,1$ g/kg. Die geschätzte Gesamtdosis an Annonacin bei Patienten mit Gd-PSP oder Gd-PDC ist somit im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu Patienten mit idiopathischem Parkinsonsyndrom signifikant erhöht und etwa 20 Mal so hoch wie die Dosis von 106 mg/kg, die im Tierversuch nach 28 Tagen zu einer ausgeprägten Neurodegeneration führt. Die orale

bzw. parenterale Bioverfügbarkeit von Annonacin im Menschen ist jedoch unbekannt und bleibt bei dieser Schätzung unberücksichtigt (Champy et al., 2005; Lannuzel et al., 2007).

Für die Hypothese einer Annonacin-induzierten Tauopathie sprechen weitere *in vitro*-Studien, die belegen, dass Annonacin zu einer intrazellulären Tau-Umverteilung führt, so wie sie an Hirnzellen der auf Guadeloupe untersuchten Patienten zu finden ist. Die 48-stündige Behandlung kultivierter striataler Neurone fetaler Ratten führt zu einer Tau-Umverteilung von den Axonen in das Zellsoma. Ursächlich für die Umverteilung ist die zelluläre ATP-Reduktion via Komplex I-Inhibition, die zu einem retrograden axonalen Transport von Mitochondrien führt, an deren Oberfläche Tau-Moleküle transportiert werden. Die somatische Tau-Akkumulation lässt sich auch durch andere Neurotoxine, die ebenfalls zu einer Energieverarmung der Zelle führen (MPP⁺, 3-NP, CCCP), reproduzieren. Allerdings bedarf es einer deutlich geringeren Konzentration an Annonacin um die gleichen Effekte hervorzurufen. In Folge der Tau-Umverteilung kommt es zum Zusammenbruch des Mikrotubuli-Gerüsts in Neuriten und Axonen und zum Zelltod (Escobar-Khondiker et al., 2007).

1.3.2.5 Tropische Foci von atypischem Parkinsonismus

Eine erhöhte Prävalenz von atypischem Parkinsonismus wurde nicht nur auf Guadeloupe, sondern in vier weiteren geographisch umschriebenen tropischen Regionen beobachtet. Dazu gehören die Insel Guam, Neuguinea, die japanische Kii-Halbinsel und die südpazifische Inselgruppe Neukaledonien (Caparros-Lefebvre et al., 2006). Untersuchungen an Patienten in drei der fünf Regionen (Guadeloupe, Guam und die Kii-Halbinsel) zeigen, dass die klinisch-phänotypische Ausprägung des atypischen Parkinsonismus an allen drei Orten ähnlich ist (Steele et al., 2002). Die auf Guam und der japanischen Kii-Halbinsel vorkommende Form von atypischem Parkinsonismus ist bekannt als Amyotrophe Lateralsklerose/Parkinsonismus-Demenz-Komplex (ALS/PDC). Immunologische Untersuchungen an Gehirnen betroffener Patienten zeigen einen ausgeprägten Nervenzellverlust und die Ablagerung von NFTs, die sich wie bei der Alzheimer-Erkrankung aus allen sechs Tau-Isoformen zusammensetzen (Kuzuhara et al., 2001), im Gegensatz zum atypischen Parkinsonismus auf Guadeloupe mit PSP-ähnlichem Bänderungsmuster (Caparros-Lefebvre et al., 2002).

Ebenso wie auf Guadeloupe konnte bei Patienten mit atypischem Parkinsonismus auf Neukaledonien ein erhöhter Konsum von Produkten der Annonaceae nachgewiesen werden. Nicht nur das gehäufte Auftreten, sondern auch der klinische Phänotyp des atypischen

Parkinsonismus erinnern dabei an die auf Guadeloupe zu findende Form (Angibaud et al., 2004; Caparros-Lefebvre und Steele, 2005).

Die klinisch übereinstimmenden Beobachtungen an unabhängigen Populationen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund, sprechen für die Bedeutung von natürlichen Toxinen in der Genese der beschriebenen neurodegenerativen Syndrome. Während auf Guadeloupe und Neukaledonien die Acetogenine der Annonaceae als potentielle Induktoren der dort zu findenden PSP-ähnlichen Sonderform des Parkinsonismus identifiziert wurden, ist das gehäufte Auftreten an den anderen Orten (Guam, Kii-Halbinseln, Neuguinea) noch weitgehend ungeklärt. Jedoch könnten auch dort endemische Neurotoxine, wie die Acetogenine und Rotenon, eine Rolle spielen. So werden auch auf Guam Früchte der Annonaceae konsumiert und Rotenon-enthaltende Pflanzen wurden bis 1940 zum Fischen benutzt. Zudem findet Rotenon in Japan weiterhin Anwendung als Pestizid im ökologischen Landbau (Caparros-Lefebvre und Steele, 2005; Caparros-Lefebvre et al., 2006).

1.4 Ziel der Arbeit

Hauptziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob ein pathogenetischer Synergismus zwischen der Intoxikation mit dem Acetogenin Annonacin, einem lipophilen Komplex I-Inhibitor, und der R406W-Mutation im MAPT-Gen bezüglich der Entstehung der FTDP-17 besteht.

Folgende Fragen sollten geklärt werden:

1. Führt Annonacin *in vivo* zu einer somatodendritischen Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau?
2. Führt die Annonacinexposition zu einer verstärkten Tau-Pathologie in Mäusen, die eine genetische Prädisposition (Überexpression von humanem punktmutiertem Tau) aufweisen?
3. Führt die Annonacinexposition zu neuronalem Zelltod und/oder Astroglieose?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde ein transgenes Mausmodell (Mäuse mit R406W-punktmutiertem humanem Tau versus Wildtyp-Mäuse) verwendet und eine *in vivo* Intoxikation mit Annonacin mittels subkutan implantierter Minipumpen durchgeführt. Die neuropathologischen Auswirkungen der Annonacinbehandlung und deren Zusammenwirken

mit der Genmutation (im Vergleich zu Placebo- und Wildtyp-Gruppen) wurden mittels immunhistochemischer Darstellung der Neurone, Gliazellen und des hyperphosphorylierten Tau-Proteins untersucht und mittels stereologischer Verfahren und optischer Dichtemessung quantifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Bezugsquellen

2.1.1 Antikörper

Primäre Antikörper	Herkunft	Epitop	Verdünnung	Produzent
AT 180	Maus, monoklonal	pT231	1:100	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
AT 8	Maus, monoklonal	pS202/pT205	1:100	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
NeuN	Maus, monoklonal		1:1000	Millipore, Billerica, MA, USA
Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Kaninchen, monoklonal		1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Iba-1	Kaninchen, monoklonal		1:2000	Wako Chemicals, Richmond, VA, USA

Sekundäre Antikörper				
IgG	Esel, monoklonal	anti-Maus oder anti-Kaninchen	AT 180/ AT8: 1:500 NeuN/GFAP/Iba-1: 1:400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

2.1.2 Chemikalien

Tieroperationen

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Polyethylenglykol 400 (PEG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaCl 0,9%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ketamin 10%	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, DE
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%)	Bayer AG, Leverkusen, DE
Ethanol 70%	Fischar, Saarbrücken, DE

Prozessierung

Pentobarbital	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Hessen, DE
Isopentan	Merck, Darmstadt, Hessen, DE
Saccharose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Immunhistochemie

Normales Eselserum (engl.: normal donkey serum, NDS)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain Elite ABC Kit)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Diaminobenzidin (DAB)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
H ₂ O ₂ 30%	Merck, Darmstadt, DE
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 70%, 96%, 100%	Merck, Darmstadt, DE
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Corbit	Kobe KG, Marburg, DE

2.1.3 Lösungen

0,2 M Phosphatpuffer (PB)	6,35 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 27,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ Ad 1000 ml Aqua dest. 0,1 M: 1:1 Verdünnung mit Aqua dest.
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate-buffered saline, PBS)	0,2 g KCl 8 g NaCl Ad 1000 ml 0,1 M PB, pH=7.4
PFA-Lösung (8%)	241,66 ml Aqua dest. (60° warm) 20 g PFA (unter Rühren zugeben) 1 Tropfen 30% NaOH Lösung filtrieren Perfusionslösung (4%): 1:1 Verdünnung mit 0,2 M PB
Natriumazidlösung (0,01%)	2 g Natriumazid ad 1000 ml 0,1 M PB
DAB-Lösung	Vorverdünnung: 5 mg DAB-Pulver 1 ml PB-Puffer = 0,5% DAB-Lösung Vor Gebrauch: 1:10 Verdünnung mit PB = 0,05% DAB-Lösung

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Pinzetten, Schere, Klemme	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
PeqGOLD Tissue DNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Einmalrasierer	
Spritze Injekt Luer Solo 2/5/10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmalkanüle Sterican 0,55x25 mm BL/LB	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmalkanüle Sterican 0,40x20 mm BL/LB	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Osmotische Minipumpen Alzet® 1003	Charles River Laboratories, Sulzfeld, DE
Microtommesser Low Profile Leica 819	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Kryoflaschen, glas	Scherf Präzision Europa GmbH, Meiningen, DE

Material und Methoden

CryoPure 2,0 ml Kryofläschchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Schraubröhre, 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Serologische Pipettenspitzen blau 1000 µl, gelb 200 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Serologische Pipettenspitzen weiß 10 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Serologische Pipette, 50 ml, 25 ml, 10 ml, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Combitips 1 ml/10 ml/25 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Pasteurpipetten, Glas, 45 mm	Hirschmann Laborgerät, Eberstadt, DE
Menzel- Gläser, geschnitten, 76x26 mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Menzel- Gläser, Deckgläser, 24x60 mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
handelsübliche Naturhaar-Pinsel Größe 0	
Parafilm, Größe 4 inch	Kobe KG, Marburg, DE

2.1.5 Geräte und Zubehör

Perfusionspumpe MasterFlex Pump Controller	Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA
Kryostat CM3050 S	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Petrischale, quadratisch, 100 mm, 25 Kompartments	Bibby Sterilin, Staffs, GB
Netwell Einsätze - Maschengröße 74 nm	Costar Corning, Lowell, MA, USA
Netwell Tragegestell 15 mm	Costar Corning, Lowell, MA, USA
12Well Zellkulturplatten	Costar Corning, Lowell, MA, USA
Eppendorf Reference Pipetten 1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Multipipette	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Duroplan® Petrischale	
Messbecher 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml	Schott AG, Mainz, DE
Messzylinder 100:1 ml	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waagen Kern 440-47N, 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE

Stoppuhr	TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Reicholzheim, DE
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Stereo Investigator-Software Version 8.10.2	MicroBrightField Inc., Williston, VT, USA
Microphot-FX Mikroskop	Nikon, Tokio, Japan
Digitale Videokamera CX9000	MicroBrightField, Inc., Williston, VT, USA
Steuerung des Objektstischs 99S100	Ludl Electronics, Hawthorne, NY, USA
Leuchttisch Carylizer eVision exe.cutive	Kaiser Fototechnik, Buchen
Mikroskop	Zeiss, Jena, DE
Objektive	Nikon Plan 2x/0,05 Zeiss Plan 10x/0,22 Zeiss Plan 25x/0,60 Zeiss Plan 40x/0,65
Kamera Olympus E-330	Olympus Imaging Corp.
Componon-S 2.8/50 Vergrößerungslinse + 130 mm Auszug (+2,5 cm Aufsatz)	Schneider Kreuznach, Bad Kreuznach, DE
Image J	U.S. National Institutes of Health, MD, USA, http://imagej.nih.gov/ij/
GraphPad Prism 5.0- Software	La Jolla, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Transgene Mäuse mit der R406W-Taumutation wurden von Virginia M.-Y. Lee, University of Pennsylvania, School of Medicine (Philadelphia, USA), zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der R406W-Mutante wurde ein cDNA-Konstrukt mit der punktmutierten längsten humanen Tau-Isoform verwendet, welches an der Restriktionsschnittstelle XhoI in den Prion-Promotor (MoPrP.Xho)-Expressionsvektor der Maus kloniert wurde. Das so erhaltene 15,3 kb lange Rekombinations-Konstrukt, bestehend aus dem R406W-mutierten humanen Tau-Gen, dem MoPrP-Promotor und flankierenden untranslatierten Gensequenzen, wurde anschließend in eine fertilisierte Mauseizelle der Linie C57BL6 x C3H (B6C3/F1) mikroinjiziert und in pseudo-

trächtige Weibchen implantiert (Zhang et al., 2004). Die nicht-transgenen Wildtyp-Tiere wurden vor dem gleichen genetischen Hintergrund angezüchtet. Transgene und nicht-transgene Tiere wurden im homozygoten Zustand vermehrt. Für die Versuchsdurchführung wurden lediglich männliche, homozygote Tiere verwendet. Die Tiere wurden durch Untersuchung von DNA-Proben vom Schwanz der Tiere mit Hilfe eines DNA-Isolations-Kit (pekGOLD Tissue DNA-Kit) auf die Anwesenheit des Transgens untersucht. Die kortikale Expression des mutierten humanen Proteins wurde mittels Western Blot sichergestellt.

2.2.2 Komplex I-Inhibition

Annonacin, ein lipophiler Inhibitor des mitochondrialen Komplex I der Atmungskette, gehört zur Gruppe der Acetogenine. Diese Substanzgruppe aus lipophilen Komplex I-Inhibitoren findet sich in Pflanzen, die zur Familie der Annonaceae gehören (Cavé et al., 1997). Das in dieser Arbeit verwendete Annonacin wurde freundlicherweise von Pierre Champy (Université Paris Sud 11, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Wie in Champy et al. beschrieben, wurde Annonacin mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) aus getrockneten Wurzeln der *Annona muricata* extrahiert und auf seine Reinheit überprüft (Champy et al., 2004).

2.2.3 Annonacinexposition

Für die Durchführung der Tierversuche lag eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen (V54-19c20/15(1)MR20/15-Nr03/2005) vor und alle Versuche wurden entsprechend den Tierschutzrichtlinien der europäischen Kommission (Directive 86/609/EEC) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in transparenten Polycarbonatkäfigen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser und unter weitgehend konstanten Umweltbedingungen mit 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 26 °C gehalten. Zum Zeitpunkt der Operation waren die Tiere 16-18 Wochen alt und wogen 30-40 g. Die transgenen, wie auch die Wildtyp-Tiere wurden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt, die über einen Zeitraum von drei Tagen mit Annonacin in verschiedenen Konzentrationen bzw. einer Trägerlösung infundiert wurden (siehe Tab. 5).

	R406W^{+/+} -Tiere (n= 42)	R406W^{-/-} - Tiere (n= 41)
Gruppe 1	Trägerlösung	Trägerlösung
Gruppe 2	6 mg/kg/d Annonacin	6 mg/kg/d Annonacin
Gruppe 3	9 mg/kg/d Annonacin	9 mg/kg/d Annonacin

Tab. 5 Übersicht über die Untersuchungsgruppen

Die Testsubstanzen wurden unter Verwendung osmotischer Minipumpen (Alzet® mini-osmotic pumps, Model 1003) appliziert. Diese Pumpen haben ein Fassungsvermögen von 100 µl und geben 1,04 µl/h des Wirkstoffs gleichmäßig über 3 Tage ab. Die Pumpen wurden mit Annonacin oder nur mit der Trägerlösung bestehend aus einer 1:1-Verdünnung aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und Polyethylenglykol 400 (PEG) gefüllt. Vor der Implantation wurden die befüllten Pumpen für mindestens 4h in steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung inkubiert. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 10 ml/kg einer 1:1:8-Verdünnung aus Ketamin, Xylazin und isotonischer Kochsalzlösung, entsprechend einer Dosis von 10 mg/kg Ketamin und 20 mg/kg Xylazin, anästhesiert. Die Implantation der Pumpen erfolgte in eine subkutan präparierte paravertebrale Tasche. Dazu wurde die Haut im Bereich der Inzision rasiert und über der Implantationsstelle sorgfältig desinfiziert. Es wurde eine 1-1,5 cm lange Querinzision im tiefen Nackenbereich gesetzt, von wo aus die stumpfe, subkutane Präparation nach kaudal erfolgte. In den so präparierten subkutanen Raum wurden die Pumpen implantiert und die Inzision durch ein bis zwei Einzelknopfnähte verschlossen. Die Verwendung der osmotischen Pumpen ermöglichte die systemische Annonacinintoxikation durch kontinuierliche Wirkstoffabgabe und Resorption aus dem subkutanen Depot über den gewünschten Zeitraum von insgesamt drei Tagen. Insgesamt wurden 41 Wildtyp-Tiere und 42 R406W-mutierte-Tiere in Abhängigkeit von ihrem Körpergewicht mit einer Rate von 0, 6 oder 9 mg/kg/d Annonacin intoxikiert. Jedes Tier wurde vor und nach der 3-tägigen Infusionsperiode gewogen.

2.2.4 Gewebepräparation

Nach dreitägiger Toxinexposition erhielten die Tiere eine letale Dosis von 200 mg/kg Pentobarbital intraperitoneal. Nach Eröffnung des Thorax und Abklemmung der Aorta descendens erfolgte die transcardiale Perfusion mit eiskalter 0,1 M Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS, engl. für: phosphate-buffered saline) über zwei Minuten. Die Gehirne wurden entnommen und durch einen Sagittalschnitt zweigeteilt. Die Hemisphäre, die zur weiteren histologischen Bearbeitung diente, wurde 24h in 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M PBS fixiert. Anschließend wurden die Gehirne in 10%-iger Saccharose in 0,1 M PBS über 48h dehydriert, in Isopentan bei -30°C über 2 min eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Gehirne wurden bei -20°C mittels eines Kryostat in einer Schnittdicke von 40 µm in 10 Schnittserien transversal geschnitten. Bis zur immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte in 0,1 M PBS mit 0,01% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

Die in dieser Arbeit nicht verwendeten Hirnhälften dienten der biochemischen Analyse mittels Western Blot.

2.2.5 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Darstellung der Tau-Neurone und Gliazellen erfolgte durch die Peroxidase-Streptavidin-Biotin-Methode unter Verwendung eines kommerziellen ABC-Kit (engl.: **avidin-biotin-peroxidase complex**). Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Gehirnschnitte einer Schnittserie wurden auf Färbeschalen verteilt und zu Beginn sowie nach jedem weiteren Schritt dreimal 10 min mit 0,1 M PBS gewaschen. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch 15-minütige Inkubation mit 3% H₂O₂ und 10% Methanol in 0,1 M PBS blockiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte die 1-stündige Präinkubation mit 5% normalem Eselserum (NDS, *normal donkey serum*) in 0,1 M PBS und 0,3% Triton X-100, das die Permeabilität der Zellmembran erhöht und somit die Bindung der Antikörper erleichtert. Nach Zugabe des primären Antikörpers, verdünnt in 0,1 M PBS, 5% NDS und 0,3% Triton X-100, wurden die Schnitte über 12h bei 4°C gelagert. Der entsprechende sekundäre biotinylierte Antikörper in 0,1 M PBS und 0,3% Triton wirkte über 1h bei Raumtemperatur ein. Der Avidin-Peroxidase-Komplex (Vectastain Elite ABC Kit, Reagenz A und B je 1:200 in 0,1 M PBS) wurde 30min vor Gebrauch angesetzt und die Schnitte über 1h darin inkubiert. Die Färbereaktion erfolgte mit einer 1:10-Verdünnung von Diaminobenzidin (DAB) in 0,1 M PBS.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,01% H₂O₂ gestartet und unter Sichtkontrolle nach 3-5min durch Waschungen in 0,1 M PBS gestoppt. Die gefärbten Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und in aufsteigender Alkoholreihe sowie Xylol dehydriert. Dann wurden die Objektträger mit Corbit-Balsam eingedeckt.

2.2.6 Stereologische Analyse

Die stereologische Auswertung der gefärbten Gehirnschnitte erfolgte anhand eines Computer-gestützten Systems, das mit einem Microphot-FX Mikroskop verbunden ist, sowie unter Verwendung einer Stereo Investigator-Software. Das Mikroskop ist mit einer digitalen Videokamera ausgestattet. Der motorisierte Objektträgertisch kann mit Hilfe eines Joysticks präzise entlang der x- und y-Achse bewegt werden und ermöglicht so ein schnelles Auffinden der gewünschten Gehirnschnitte und -regionen. Mit Hilfe dieses Systems kann das mikroskopische Bild am PC bearbeitet und können histologische Strukturen markiert werden, in denen dann rechnergestützt Zellzählungen durchgeführt werden. Zur Zählung der Neurone wurde ein 40-fach Ölimmersionsobjektiv (Nikon Plan 40x Öl Objektiv) verwendet. Die Dicke der Hirnschnitte nach Dehydratation und Einbettung betrug durchschnittlich 18 µm. Eine Zelle wurde als Tau-positiv gezählt, wenn sie sich in der immunhistochemischen Färbung deutlich dunkelbraun gefärbt vom Hintergrund abhob, sowie ein rundliches bis polygonales Soma mit großem, hellerem Kern und schmalem Zytoplasmasaum zeigte. Die Auswertung erfolgte grundsätzlich verblindet. Die Zellzählung erfolgte in den folgenden Hirnregionen: Frontalcortex, Parietalcortex und Amygdala (Regions of interest, ROI), sowie für GFAP- und Iba1-positive Neurone im Hippocampus.

2.2.6.1 Optical Fractionator-Methode

Die Zellquantifizierung wurde unter Anwendung der *Optical Fractionator*-Methode durchgeführt, einer stereologischen Methode, nach der ein Gesamtvolumen in mehreren Teilungsschritten in definierte Fraktionen zerlegt wird. Diese Fraktionierung erlaubt die stichprobenartige Auszählung in einem Bruchteil des Gesamtvolumens. Aus der so erhaltenen Zellzahl kann die totale Zellzahl des Gesamtvolumens durch Multiplikation mit dem Kehrwert der Fraktionen geschätzt werden. Diese Methode ist unbeeinflusst durch Gewebeveränderungen, wie Schwellung, Schrumpfung oder Kompression, die im Rahmen

der histologischen Verarbeitung auftreten können (Gundersen, 1986). Zur Gewinnung einer repräsentativen Stichprobe, die frei ist von systematischen Fehlern, ist es entscheidend, dass alle Bereiche der Region, in der die Zellquantifizierung stattfinden soll, die gleiche Wahrscheinlichkeit haben ausgewählt zu werden. Entsprechend der *Fractionator*-Methode erfolgte somit zunächst die Gewinnung der Gewebeproben nach dem Prinzip des *systematic random sampling* (SRS): da die Gehirne geschnitten wurden, ohne dass die exakte Position der ROI bekannt war, kann der erste untersuchte Gehirnschnitt als Zufallsauswahl betrachtet werden, von dem aus die weiteren Gehirnschnitte systematisch unter Einhaltung eines einheitlichen Abstandes gesammelt wurden. Da die Schnitte in 10er Serien gesammelt wurden und nur eine Serie pro Tier gefärbt und ausgewertet wurde, betrug die so erhaltene Fraktion (*section sampling fraction, ssf*) $1/10$. Im Folgenden wurde die ROI markiert und die so erhaltene Fläche wiederum nach dem SRS-Prinzip fraktioniert, indem sie durch *counting frames* bekannter Größe und in definiertem Abstand auf der x- und y-Achse zueinander abgedeckt wurde. Die Markierung der ROI wurde unter einem 2-fach-Objektiv durchgeführt, wobei Frontal- und Parietalcortex unter Zuhilfenahme von Hippocampus und Striatum als anatomische Leitstrukturen durch eine Kontur eingerahmt wurden. Dies erfolgte an drei aufeinander folgenden Schnitten einer 10er Serie. Durch die Stereo Investigator-Software wird ein zufällig platziertes Gitternetz (*sampling grid*) über die Kontur gelegt. Jede Box dieses Gitternetzes enthält einen *counting frame*, in dem die Auszählung stattfindet und der nur einen Bruchteil der Fläche einer Box des Gitternetzes – die *area sampling fraction (asf)* – abdeckt. Die Kantenlänge einer Box in x- und y-Richtung stellt somit die Entfernung von einem *counting frame* zum nächsten dar. Die zufällige Platzierung des Gitternetzes stellt die zufällige Positionierung des ersten *counting frames*, mit dem die Analyse beginnt, sicher. Die Breite und Höhe des *counting frames* betrugen $50 \times 50 \mu\text{m}$ (Parietal- und Frontalcortex) bzw. $100 \times 100 \mu\text{m}$ (Amygdala), die x- und y- Maße jeder Box des Gitternetzes $150 \times 150 \mu\text{m}$. Somit betrug die *area sampling fraction* $50 \times 50 \mu\text{m} / 150 \times 150 \mu\text{m} = 2500 \mu\text{m}^2 / 22500 \mu\text{m}^2 = 1/9$. Die durchschnittliche Schnittdicke betrug etwa $18 \mu\text{m}$, wobei je $2 \mu\text{m}$ Sicherheitsabstand zur oberen und unteren Oberfläche des Schnittes eingehalten wurden, um defekte Oberflächenstrukturen nicht mit einzubeziehen. Die so erhaltene *thickness sampling fraction (tsf)* ergibt sich aus der Schnittdicke, die zur Zellzählung verwendet wird ($14 \mu\text{m}$, siehe unten) dividiert durch die tatsächliche Schnittdicke von $18 \mu\text{m}$ ($tsf = 14/18$).

Die Zählung der Neurone erfolgte nach dem *Optical Disector*-Prinzip, das die Quantifizierung

der Neurone in dicken Gewebeschnitten ermöglicht. Durch den *Disector* wird zur 2-dimensionalen Auszählung mit Hilfe des *counting frame* eine dritte Dimension hinzugefügt. Das so erhaltene 3-dimensionale Volumen wird in konsekutive parallele Schnitte zerlegt. Nach dem ursprünglichen Prinzip des *Disectors* (auch: *physical disector*) werden zwei Schnitte, entsprechend einer *reference section* und einer *look-up section*, miteinander verglichen und ein vorher definierter einmalig vorhandener Teil des zu untersuchenden Teilchens (z.B. Teilchenanfang, Nucleolus) dann erfasst, wenn er in der *reference section*, jedoch nicht in der *look-up section* zu sehen ist. Dieses Verfahren ist unabhängig von Form, Größe, Orientierung und Verteilung der Teilchen und verhindert Doppelzählungen (Sterio, 1984). Eine Erweiterung dieses Prinzips stellt der *Optical Disector* dar, der die optische Zerlegung dicker Gewebeschnitte in verschiedene Brennebenen –entsprechend einzelnen Schnitten– ermöglicht, die durch Tiefenfokussierung über eine bestimmte Schnittdicke hinweg angesteuert werden können. So erhält man statt lediglich eines Schnittpaares eine kontinuierliche Serie übereinanderliegender Schnitte, in denen die Auszählung nach den oben beschriebenen Regeln erfolgt. Dabei zählt man die Teilchen, die in der neuen Schnittebene sichtbar werden (oder verschwinden) während man entsprechend der eingestellten *Disector*-Höhe durch ein bekanntes Volumen fokussiert. Die Tiefenschärfe in μm wird über einen am Objektisch befestigten *Mikrokator* gemessen und durch ein Diagramm auf dem Bildschirm angezeigt. Die gewählte *Disector*-Höhe betrug $14 \mu\text{m}$. Neurone die innerhalb dieser *Disector*-Höhe fokussiert werden konnten, wurden gezählt sofern sie innerhalb des *counting frame* lagen oder die Einschlusslinien am rechten und oberen Rand des *counting frame* berührten. Nicht gezählt wurden die Neurone sobald sie die Ausschlusslinien am linken und unteren Rand des *counting frame* berührten.

Nach systematischer Auszählung innerhalb der durch Fraktionierung gewonnenen Volumenstichprobe erhält man die Summe aller gezählten Neurone $\sum Q^-$, aus der sich die totale Zellzahl N durch Multiplikation mit dem Kehrwert der Fraktionen schätzen lässt (West et al., 1991):

$$N = \sum Q^- \times \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{tsf}$$

Abb. 5 Formel zur Schätzung der Zellzahl N in einem dreidimensionalen Raum gemäß der *Optical Fractionator*-Methode, wobei Q^- =gezählte Zellzahl, *ssf*=section sampling fraction, *asf*=area sampling fraction, *tsf*=thickness sampling fraction.

2.2.6.2 *Coefficient of Error* nach Gundersen

Zur Beurteilung der Präzision und damit der Reproduzierbarkeit des so gewonnenen Schätzwertes wurde der *Coefficient of Error* (CE) nach Gundersen berechnet (Gundersen et al., 1999). Hierbei handelt es sich um einen statistischen Wert, der definiert ist als Quotient aus dem Standardfehler des Mittelwerts bei wiederholten Schätzungen (*Standard error of the mean*, SEM) und dem Mittelwert der Schätzungen. Er ist ein Indikator dafür, wie stark ein Schätzwert bei wiederholter Ermittlung variiert. Der CE hat keine biologische Bedeutung, sondern ist ein nützliches Instrument zur Beurteilung der Güte eines Stichprobensystems, das zur Ermittlung eines Schätzwertes herangezogen wird. Um den CE als Mittel zum statistischen Vergleich zu nutzen, muss sein Beitrag zur Gesamtvarianz des Mittelwertes der untersuchten Stichprobe beurteilt werden. Diese Gesamtvarianz setzt sich aus der biologischen Variabilität zwischen einzelnen Individuen und der Varianz des Schätzwertes innerhalb eines Individuums zusammen. Letztere wird wiederum durch die Methodik des Schätzverfahrens beeinflusst, z.B. durch die Anzahl der verwendeten Schnitte (*section-sampling interval*) oder die *Disektor*-Intervalle, durch die der Stichprobenumfang bedingt ist. Die Gesamtvarianz der geschätzten gesamten Zellanzahl (*squared coefficient of variation*, OCV^2) lässt sich folglich als Summenformel aus der biologischen Varianz zwischen den Individuen (ICV^2) und der Varianz der Schätzwerte (CE^2) ausdrücken ($OCV^2 = ICV^2 + CE^2$) (West, 1993). Sollte der methodologische Beitrag zur Gesamtvarianz zu hoch, der CE also „zu schlecht“ sein ($CE^2 > ICV^2$ bzw. $CE^2 > 50\% OCV^2$), ist eine Anpassung des stereologischen Verfahrens zur Steigerung der Präzision, zum Beispiel durch Vergrößerung der gezählten Zellzahl oder Veränderung der Orientierung eines Schnittes, erforderlich. Dies ist insbesondere entscheidend, wenn zwischen den untersuchten Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden wurde, um einen methodologisch bedingten Fehler 2. Art zu vermeiden (Slomianka und West, 2005). Sollte jedoch die biologische Varianz (ICV^2) den Hauptbeitrag zu obiger Summenformel liefern, führt die Untersuchung einer größeren Anzahl von Versuchstieren zu einer Reduktion der Gesamtvarianz.

Nach der Erstbeschreibung von Methoden zur Beurteilung der Varianz eines Schätzwertes durch Matheron 1965, wurden diese auf stereologische Testverfahren angewendet und durch zahlreiche Autoren weiterentwickelt. Es existieren somit verschiedene Methoden, um den CE eines Schätzwertes, der auf der Basis einer einzelnen Zufallsauswahl innerhalb der untersuchten Struktur ermittelt wurde, zu bestimmen. Neben dem Verfahren nach

Gundersen, stehen z.B. der *Split Sample*-Schätzer nach Cruz-Orive (Cruz-Orive, 1990) oder das durch Schmitz etablierte Verfahren (Schmitz, 1998) zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurde der CE durch die Stereo Investigator-Software entsprechend der Formel nach Gundersen berechnet:

$$CE = \frac{\sqrt{\frac{3(A - S^2) - 4B + C}{240}}}{\sum Q_i} \quad \text{wobei} \quad \begin{aligned} A &= \sum Q_i^2 \\ B &= \sum Q_i Q_{i+1} \\ C &= \sum Q_i Q_{i+2} \\ S^2 &= \text{variance due to noise} \end{aligned}$$

Abb. 6 Formel zur Berechnung des CE nach Gundersen (nach Gundersen et al., 1999)

Diese Formel impliziert, dass die Zählereignisse einzelner untersuchter Schnitte - dargestellt als Punkte in einem Koordinatensystem - zu einer Kurve verbunden werden können, durch die die fehlende Information durch nicht verwendete Schnitte ausgeglichen wird. Sie drückt aus inwieweit diese Kurve der glatten Funktion entspricht, die die wahre Zellverteilung darstellt, das heißt wie sehr sich die geschätzte Zellzahl der tatsächlichen Zellzahl nähert. Um die Formel sinnvoll anzuwenden, ist es nötig, dass mindestens drei konsekutive Schnitte untersucht werden. Der Unterschied zwischen den so ermittelten Schätzwerten, der nicht durch die Lage auf einer definierten Kurve bedingt ist, also die Varianz, die nicht durch Kovarianz zwischen den Punkten erklärt werden kann, sondern durch das Schätzverfahren entsteht, wird durch den CE erfasst. Dabei setzt sich die Summenvarianz (CE_{total}) aus der Varianz durch die Verwendung unterschiedlicher Schnitte und der Varianz, die durch Zufallsauswahl innerhalb eines Schnittes bedingt ist, zusammen. Letztere wird auch *variance due to noise* (oder: *Nugget variance*) genannt und beschreibt die Varianz des Schätzwertes durch unterschiedliche Platzierung des Gitternetzes auf einem Schnitt (*disector sampling*). Durch die Berücksichtigung dieser durch das Schätzverfahren bedingten Fehler in der Formel, liefert dieses Verfahren auch bei großen Intervallen zwischen den einzelnen Disektoren (*disector sampling intervals*) gute Näherungswerte für den CE (www.stereology.info).

Bei der Zellquantifizierung nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde am Beispiel des Parietalcortex bei allen untersuchten Tieren eine durchschnittliche Zellzahl von 8547 AT8-positiven Neuronen ermittelt. Die Gesamtvarianz des Mittelwertes (*coefficient of variation*,

CV= SD/mean) betrug 0,46. Bei einer durchschnittlich gezählten Zellzahl von 75 Neuronen pro Tier ergab sich ein durchschnittlicher CE von 0,13 für die so ermittelten Schätzwerte. Die biologische Varianz betrug somit 92% ($1-CE^2/CV^2$) der Gesamtvarianz. Die durch das stereologische Verfahren bedingte Varianz trug folglich weniger als 10% zur Gesamtvarianz bei, so dass die Präzision der einzelnen stereologischen Schätzwerte als zufriedenstellend angesehen werden kann. Eine Übersicht über den durchschnittlichen CE und den Beitrag der biologischen Varianz zur Gesamtvarianz für die Zellquantifizierung in den R406W^{+/+}-Tieren (Regionen Frontal- und Parietalcortex) zeigt Tabelle 6.

AK	Region	N (mean)	SD	CV	CE (mean)	$1-CE^2/CV^2$
AT8	Frontal-cortex	15143	7566	0,499	0,0890	0,968
AT8	Parietal-cortex	8547	3932	0,460	0,1300	0,920
AT180	Frontal-cortex	32758	18952	0,579	0,0679	0,986
AT180	Parietal-cortex	23678	12023	0,508	0,0862	0,971

Tab. 6 Einflüsse des stereologischen Verfahrens auf die Präzision der ermittelten Zellzahl

N (mean) ist die durchschnittliche durch das stereologische Verfahren geschätzte Zellzahl (Mittelwert) für die Regionen Frontal- bzw. Parietalcortex der R406W^{+/+}-Tiere nach Färbung mit den Antikörpern AT8 bzw. AT180 (alle Gruppen). SD entspricht der Standardabweichung der Schätzwerte. CV gibt die Gesamtvarianz der Mittelwerte an ($CV=SD/ N \text{ mean}$). CE (mean) ist der durchschnittliche *Coefficient of Error* nach Gundersen ($m=1$). Der Beitrag der biologischen Varianz zur Gesamtvarianz ($1-CE^2/CV^2$) ist der letzten Tabellenspalte zu entnehmen.

2.2.7 Optische Dichtemessung

Zur Beurteilung der Immunreaktivität gegenüber phosphoryliertem Tau im Bereich des Hippocampus wurden optische Dichtemessungen im Bereich der CA (Cornu ammonis) 2/CA3-Region durchgeführt. Da in dieser Region insbesondere bei den R406W-mutierten Tieren eine extrem hohe Zelldichte vorlag, die eine genaue Abgrenzung einzelner Neurone unter dem Mikroskop nicht zuließ, konnte hier keine stereologische Analyse durchgeführt werden. Stattdessen wurden an einem Leuchttisch Fotos der zu analysierenden Schnitte aller untersuchten Tiere angefertigt. Alle Fotos sind unter exakt gleichen optischen Bedingungen (Belichtung, Blendeneinstellung, Objektiv, Belichtungszeit usw.) entstanden. Pro Tier wurden dazu drei konsekutive Schnitte ausgewählt, in denen sich die relevanten hippocampalen

Strukturen bei koronarer Schnittführung klar darstellten. Dabei wurde auf die Auswahl anatomisch weitgehend identischer Schnittebenen geachtet (von -1,3 mm bis -2 mm in Relation zum Bregma). Die Fotos wurden unter Verwendung des Image J-Bildbearbeitungsprogrammes (frei erhältlich im Internet unter: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) am Computer weiterverarbeitet. Zunächst wurden die Bilder in binarisierte Schwarz-Weiß-Bilder konvertiert und invertiert. Die CA2/CA3-Region wurde mittels einer Kontur markiert und die optische Dichte (mittlerer, sowie minimaler und maximaler Grauwert) gemessen. Entsprechend wurde auch die optische Dichte eines Areals im Bereich des Gyrus dentatus ermittelt und von dem mittleren Grauwert der CA2/CA3-Region subtrahiert. Da sich im Gyrus dentatus keine Neurone angefärbten hatten, wurde diese Region als repräsentativ für die Intensität der unspezifischen Hintergrundfärbung angesehen. Die Subtraktion der Grauwerte für jeden Schnitt gewährleistete somit die Unabhängigkeit des Ergebnisses vom unterschiedlichen Färbeverhalten der einzelnen Präparate.

2.2.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism 5.0- Software. Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) ausgedrückt. Dabei galt ein p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Experimentalgruppen wurden durch einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way Anova*) und einen Newman-Keuls Post-hoc-Test oder durch zweifaktorielle (R406W^{+/+} und R406W^{-/-}, Placebo und Annonacin) Varianzanalyse (*two-way Anova*) gefolgt von einem *Post-hoc least-significant-difference-* (LSD-)Test verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Annonacin-induzierte Mortalität

Sowohl unter den Wildtyptieren ($R406W^{-/-}$) als auch den $R406W^{+/+}$ -Tieren, die mit Dosen von 6 oder 9 mg/kg/d Annonacin über drei Tage behandelt wurden, bestand eine Mortalitätsrate von 6-13%. Im Vergleich dazu zeigten die mit der Trägerlösung behandelten Tiere beider Gruppen keine erhöhte Sterblichkeit. Unter einer höheren Annonacindosis von 12 mg/kg/d betrug die Mortalitätsrate 100% nach dreitägiger Exposition, so dass die Behandlungsdosen niedriger gewählt wurden. Auch eine längere Behandlungsdauer von 7 Tagen führte zu einer Mortalitätsrate von 84% in den Wildtyptieren. Daher wurde die Expositionszeit von drei Tagen beibehalten.

3.2 Erhöhte Phospho-Tau-Immunreaktivität in neuronalen Somata transgener Tiere

Untersucht wurde die Tau-Pathologie in einem transgenen Maus-Modell, indem Mäuse, die das $R406W$ -punktmutierte humane Tau-Gen exprimierten, mit nicht-transgenen Wildtyptieren verglichen wurden.

Die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper AT180, der an ein, an dem Aminosäurerest Threonin 231 phosphoryliertes Tau-Epitop bindet, bringt pathologisch phosphoryliertes Tau in den Nervenzellen zur Darstellung.

In den mit Trägerlösung behandelten $R406W^{+/+}$ -Tieren zeigten sich AT180-positive Neurone im Isocortex, insbesondere in Lamina 5 des Frontal- und Parietalcortex, wo sich die Somata und apikalen Dendriten zahlreicher Pyramidenzellen anfärbten. Weitere AT180-positive Neurone zeigten sich im Hippocampus, besonders intensiv in der Pyramidenzellschicht der CA3-Region und schwächer ausgeprägt in der CA1- und CA2-Region. Auch die Amygdala ließ sich in den $R406W^{+/+}$ -Tieren anhand von zahlreichen Phospho-Tau-positiven Neuronen abgrenzen. Eine identische Verteilung Phospho-Tau-positiver Neurone zeigte sich nach Färbung mit dem Antikörper AT8, der an ein, an Serin 202 und Threonin 205 phosphoryliertes Epitop bindet.

Im Gegensatz zu den R406W^{+/+}-Tieren, die im Alter von 16-18 Wochen auch ohne Annonacin-Einwirkung eine gute Immunreaktivität gegenüber AT180 und AT8 aufweisen, zeigten die mit Trägerlösung behandelten R406W^{-/-}-Tiere gleichen Alters ein sehr schwaches Färbeverhalten mit kaum nachweisbaren Phospho-Tau-positiven Neuronen (siehe Abb. 7).

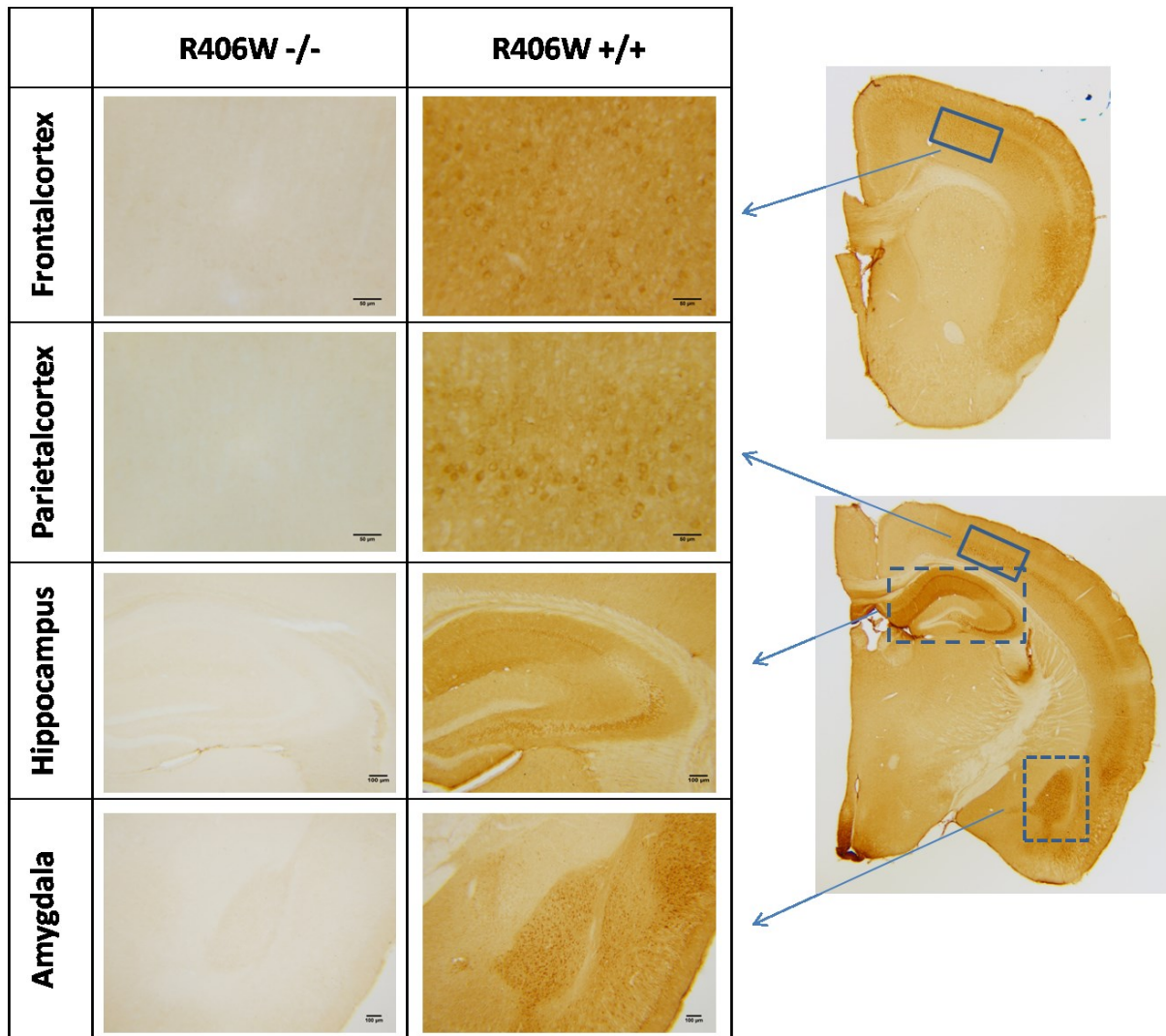


Abb. 7 Unterschiedliche Phospho-Tau Immunreaktivität in Mäusen mit und ohne punktmutiertem humanem Tau-Gen

Die rechte Spalte der Tabelle zeigt Ausschnitte der anatomischen Regionen, in denen in Mäusen mit R406W-punktmutiertem humanem Tau-Gen nach Färbung mit dem Antikörper AT180 erhöhtes Phospho-Tau in den Zellsomata nachgewiesen werden konnte. Wie in den Übersichtsbildern (2-fach-Objektiv) rechts der Tabelle dargestellt, handelt es sich bei den Abbildungen um vergrößerte Ausschnitte aus den betroffenen anatomischen Regionen: Frontalcortex (40-fach), Parietalcortex (40-fach), Hippocampus (10-fach) und Amygdala (10-fach). In der linken Tabellenspalte sind die entsprechenden anatomischen Regionen in den Wildtypmieren dargestellt.

Maßstabsbalken entspricht 50 µm in Frontal- und Parietalcortex, 100 µm in Hippocampus und Amygdala.

3.3 Annonacin erhöht Phospho-Tau in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund

Die subkutane Zufuhr von Annonacin über drei Tage führte in den behandelten R406W^{+/-}-Tieren zu einer signifikant erhöhten Phospho-Tau-Immunreaktivität in den untersuchten Regionen des Frontalcortex, Parietalcortex und Hippocampus. Im Vergleich zu den mit Trägelösung behandelten Tieren konnte in den mit Annonacin-behandelten Mäusen eine konzentrationsabhängige Zunahme von hyperphosphoryliertem Tau in den neuronalen Zellsomata der genannten Regionen nachgewiesen werden (Abb. 8 und 9). Die Stereologie-basierte Zellquantifizierung im Bereich des Frontal- und Parietalcortex ergab sowohl nach Färbung mit dem Antikörper AT8 (Abb. 8 A-D), als auch mit dem Antikörper AT180 (Abb. 9 A-D) eine signifikant erhöhte Zellzahl in den mit Annonacin behandelten Tieren. Im Hippocampus zeigte die Messung der optischen Dichte eine signifikant erhöhte Intensität der AT8- (Abb. 8 E-F) und AT180- (Abb. 9 E-F) Färbung in der CA2/3-Pyramidenzellschicht. Im Gegensatz dazu führte die Annonacin-Behandlung in den R406W^{-/-}- Mäusen zu keiner signifikanten Veränderung der AT8- und AT180-Immunreaktivität in den untersuchten Hirnregionen (Abb. 8 und 9).

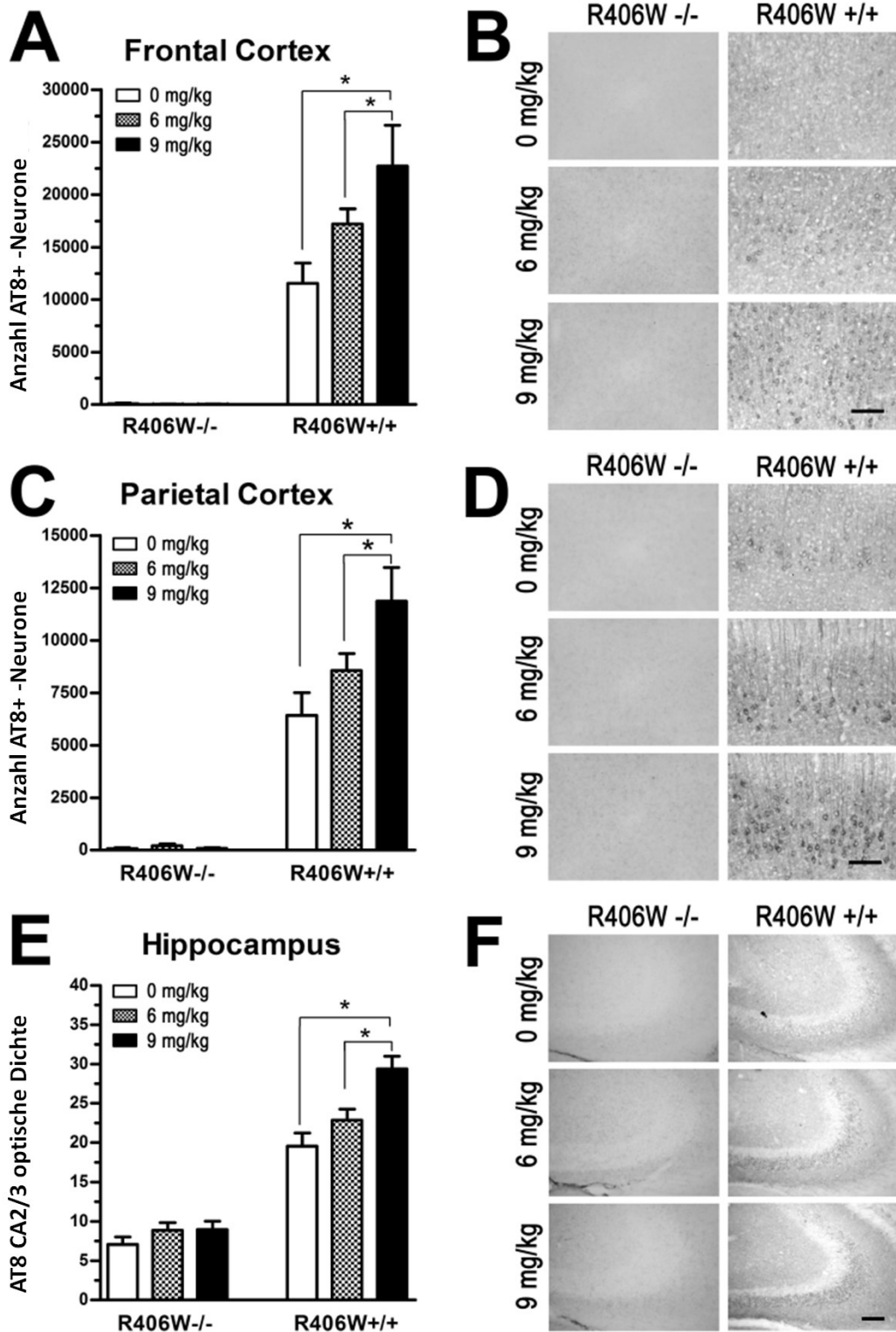


Abb. 8 Phospho-Tau-Immunreaktivität in R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}- Mäusen nach Färbung mit dem Antikörper AT8

Die Abbildungen A-F zeigen die dosisabhängige Zunahme der somatodendritischen Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau nach Intoxikation mit 0, 6 und 9 mg/kg/d Annonacin über drei Tage. Es kommt zu einer signifikanten Zunahme von phosphoryliertem Tau im Frontalcortex (A, B), Parietalcortex (C, D) und im Bereich der CA2/3-Region des Hippocampus (E, F) in R406W^{+/+}-, jedoch nicht in R406W^{-/-}- Mäusen.

*p<0,05 ANOVA gefolgt von post hoc LSD-Test. Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

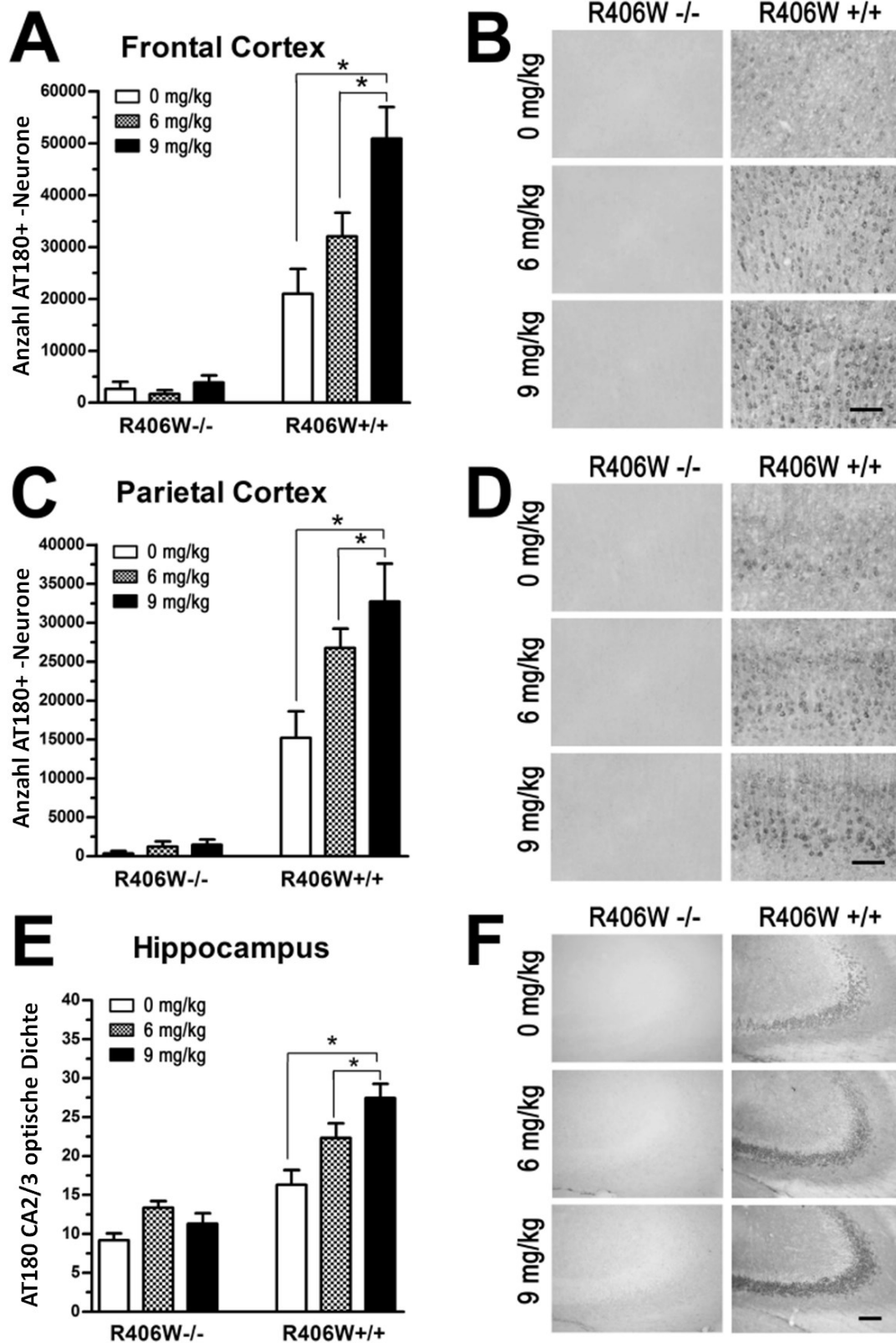


Abb. 9 Phospho-Tau-Immunreaktivität in R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}- Mäusen nach Färbung mit dem Antikörper AT180

Die Abbildungen A-F zeigen die dosisabhängige Zunahme der somatodendritischen Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau nach Intoxikation mit 0, 6 und 9 mg/kg/d Annonacin über drei Tage. Es kommt zu einer signifikanten Zunahme von phosphoryliertem Tau im Frontalcortex (A, B), Parietalcortex (C, D) und im Bereich der CA2/3-Region des Hippocampus (E, F) in R406W^{+/+}-, jedoch nicht in R406W^{-/-}- Mäusen.

*p<0,05 ANOVA gefolgt von post hoc LSD-Test. Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

3.4 Fehlender Annonacin-Effekt in der Amygdala

In der Amygdala zeigte sich bereits in den mit Trägerlösung behandelten R406W^{+/+}-Tieren eine ausgeprägte Immunreaktivität gegenüber AT8 und AT180. Nach Zufuhr von Annonacin bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der Dichte Phospho-Tau-positiver Neurone. In den R406W^{-/-}-Tieren zeigte sich nach Färbung mit dem Antikörper AT180 ebenfalls kein nachweisbarer Annonacineffekt im Bereich der Amygdala, die sich in diesen Tieren nur schwach anfärbte und kaum Phospho-Tau-positive Neurone enthielt (siehe Abb. 10). Nach Färbung mit dem Antikörper AT8 kamen in den R406W^{-/-}-Tieren im Bereich der Amygdala keine Neurone zur Darstellung, so dass hier keine Zellquantifizierung erfolgen konnte.

Über die hier untersuchten Hirnregionen hinaus zeigte sich nach Behandlung mit Annonacin keine nachweisbare Phospho-Tau-Akkumulation in anderen Hirnregionen (bezogen auf die hier gefärbten koronaren Schnitte vom Beginn des Striatums bis zum Beginn des Cerebellums). Eine Tau-Akkumulation in den Somata von Gliazellen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

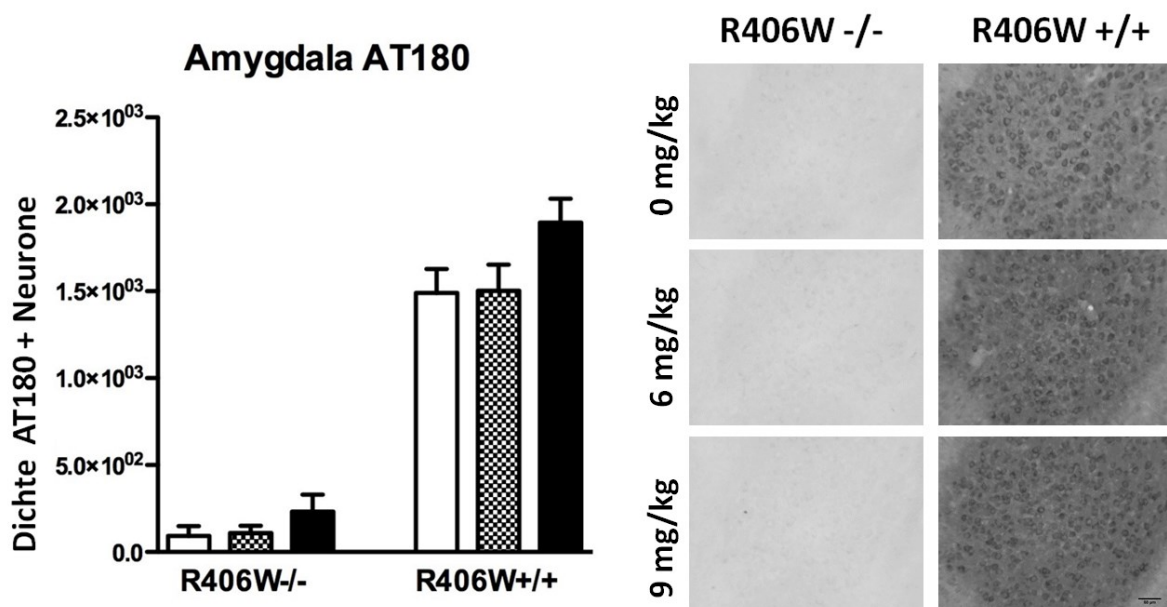


Abb. 10 Phospho-Tau-Immunreaktivität in der Amygdala in R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}- Mäusen nach Färbung mit dem Antikörper AT180

In den Untersuchungsgruppen zeigte sich eine unveränderte Dichte an Phospho-Tau positiven Neuronen unter Behandlung mit Annonacin in aufsteigender Konzentration.

3.5 Annonacin und neuronaler Zelltod

Die immunhistochemische Färbung mit dem NeuN-Antikörper, der an das Neuronenspezifische Protein NeuN bindet, das sich in neuronalen Nuclei, Perikaryen und den proximalen Zellfortsätzen von fetalen und adulten Neuronen der Maus und anderer Vertebraten befindet, ermöglicht die stereologische Quantifizierung neuronaler Zellen in den mit Annonacin behandelten und den Kontroll-Tieren beider Gruppen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die 3-tägige Annonacin-Intoxikation nicht ausreicht, um einen neuronalen Zellverlust in den untersuchten Hirnregionen der R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}-Tiere hervorzurufen.

Die statistische Analyse der Daten mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und post-hoc Bonferroni Test ergab eine signifikante Wechselwirkung zwischen dem Genotyp der Mäuse und der Annonacinbehandlung hinsichtlich der Neuronenzahl im Bereich des Frontalcortex (Abb. 11 A-B; $F=3,84$, $p=0,047$). Die Analyse der Daten aus den Regionen Parietalcortex (Abb. 11 C-D; $F=0,003$, $p=0,996$), Hippocampus (Abb. 11 E-F; $F=0,768$, $p=0,478$) und Amygdala (nicht abgebildet) konnte jedoch keine signifikante Wechselwirkung zwischen dem Genotyp der Tiere und der Annonacinbehandlung nachweisen.

Insgesamt zeigte sich, dass der Genotyp der Tiere (R406W^{+/+} versus R406W^{-/-}) einen signifikanten Effekt auf die beobachtete Varianz hatte. So war die Anzahl an Neuronen in allen untersuchten Regionen bei den R406W^{+/+}-Tieren signifikant niedriger als bei den R406W^{-/-}-Tieren. Dieser Unterschied bestand unabhängig von der Annonacinbehandlung (0, 6 oder 9 mg/kg/d), für die kein signifikanter Effekt auf die Neuronenzahl in den untersuchten Hirnregionen nachgewiesen werden konnte. Lediglich in den R406W^{+/+}-Tieren, die mit 9 mg/kg/d Annonacin behandelt wurden, ließ sich die Tendenz zu einer niedrigeren Neuronenzahl im Vergleich zu den unbehandelten Tieren erkennen ($p=0,09$).

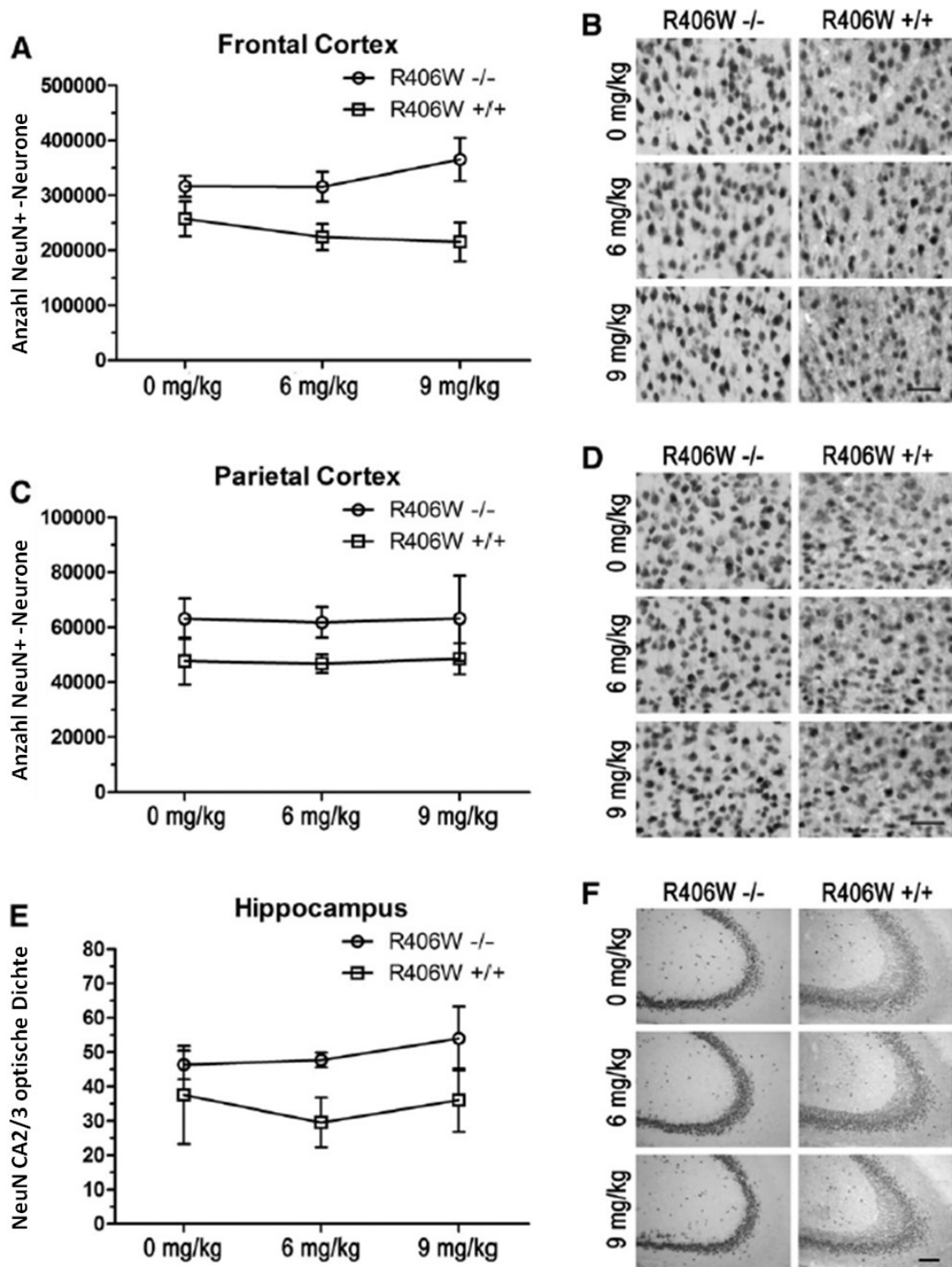


Abb. 11 Immunhistochemische Darstellung der Neurone in R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}-Mäusen nach Färbung mit dem Antikörper NeuN (Behandlungsgruppen 0, 6 und 9 mg/kg/d Annonacin)

A-F Die Stereologie-basierte Quantifizierung der NeuN⁺-Neurone erfolgte im Frontalcortex (A,B) und Parietalcortex (C,D). Im Hippocampus erfolgte die optische Dichtemessung der granulären Zellschicht der CA2/CA3-Region (E,F). Die Analyse der Ergebnisse zeigt, dass in den R406W^{+/+}-Tieren in allen untersuchten Hirnregionen eine signifikant niedrigere Neuronenzahl vorliegt als in den R406W^{-/-}-Tieren (2-way ANOVA: Frontalcortex p= 0,000, Parietalcortex p=0,001, Hippocampus p=0,000). Die Annonacinbehandlung hatte jedoch keinen Effekt auf die Neuronenzahl.

Maßstabsbalken entspricht 50 µm in B und D, 100 µm in F.

3.6 Annonacin und Neuroinflammation

Da eine Toxin-induzierte Schädigung des Gehirns häufig mit einer Aktivierung von Mikro- und Astroglia als Ausdruck eines neuroinflammatorischen Prozesses assoziiert ist, erfolgte die immunhistochemische Färbung der Gliazellen mittels Anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und Anti-Iba1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*).

Die Annonacinexposition bewirkte keine Veränderung der Anzahl an Mikroglia, die durch immunhistochemische Färbung mit dem Iba1-Antikörper sichtbar gemacht wurden (Abb. 12). Iba1 gehört zur Gruppe der Calcium-bindenden Proteine und wird ausschließlich in Zellen monozytärer Abstammung exprimiert (Imai et al., 1996; Ito et al., 1998). Im ZNS findet sich das Protein ausschließlich in Mikroglia. Die Aktivierung von Mikroglia im Rahmen neuronaler Schädigung führt zu einer Hochregulation der Proteinexpression (Deininger et al., 2002; Ito et al., 1998).

Das GFA-Protein wurde 1971 erstmals als Hauptbestandteil des astrozytären Zytoskeletts beschrieben (Eng et al., 1971). Es gehört wie Desmin, Vimentin und Peripherin zur Klasse III der Intermediärfilament-Proteinfamilie und wird überwiegend in Astrozyten und anderen Gliazellen exprimiert (Fuchs and Weber, 1994). Als Bestandteil des Zytoskeletts trägt das GFAP entscheidend zur Stabilität der astrozytären Zellfortsätze bei und beeinflusst somit Form und Mobilität der Astrozyten. Nach einer Schädigung des ZNS in Folge von Trauma, Erkrankung, genetischer oder chemischer Einflüsse kommt es zu einer Aktivierung der Astrozyten in Form einer reaktiven Astroglie, die mit einer vermehrten GFAP-Synthese einhergeht und somit durch immunhistochemische Färbung von GFAP nachgewiesen werden kann (Eng et al., 2000).

Die Färbung von je drei Mäusehirnen pro Untersuchungsgruppe (0, 6 und 9 mg Annonacin/kg/d für R406W^{+/+} und R406W^{-/-}-Tiere) mit Anti-GFAP und die anschließende stereologische Quantifizierung der Astrozytenzahl im Hippocampus ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen (Abb. 13). Somit führten weder die genetische Alteration, noch das Neurotoxin, noch die Kombination aus beidem in diesem Versuchsaufbau zu einer immunhistochemisch nachweisbaren Astroglie. Sowohl die Intensität, als auch die Verteilung und Morphologie der GFAP-positiven Neurone waren in den untersuchten Gruppen unverändert.

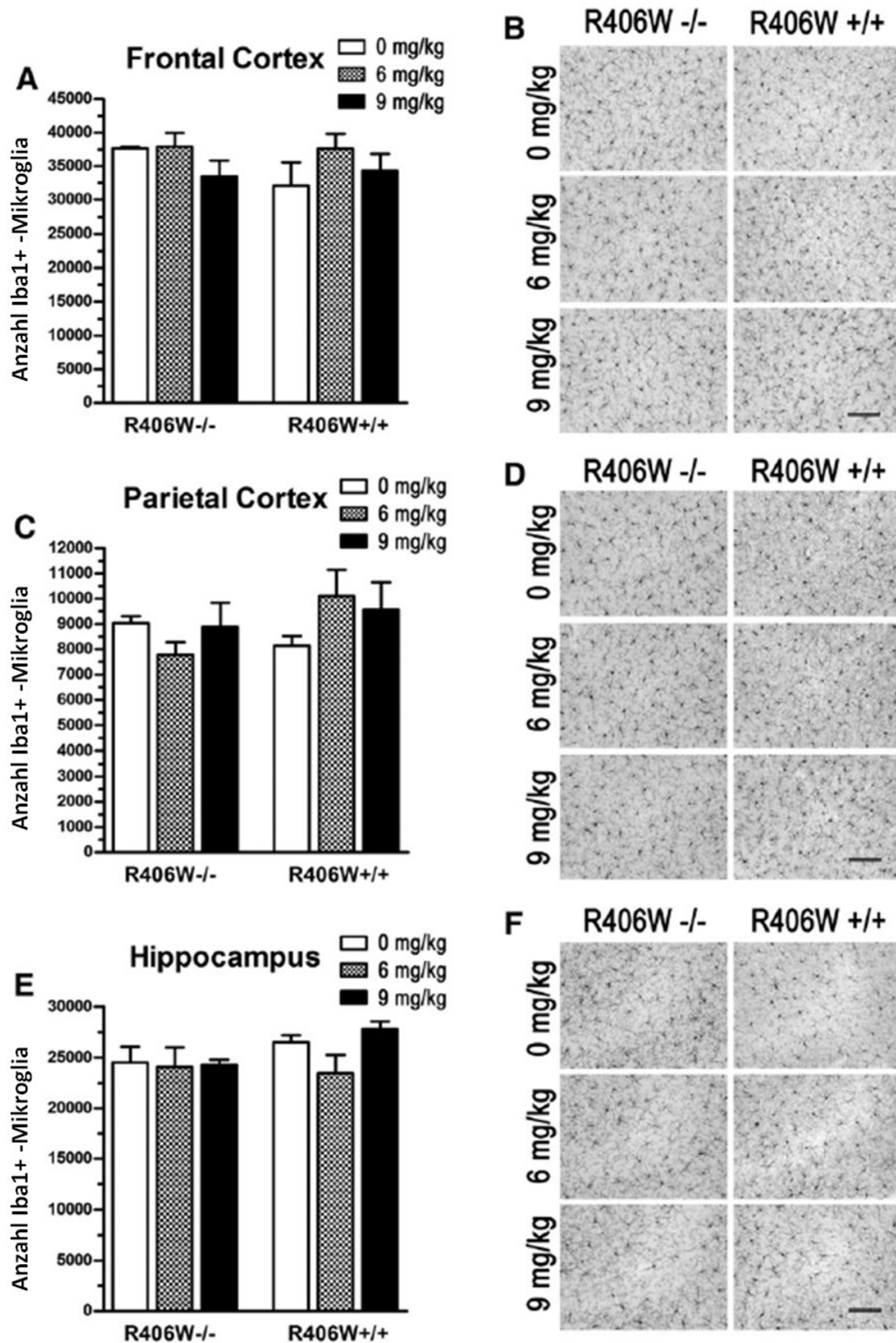


Abb. 12 Immunhistochemische Darstellung der Mikroglia in R406W^{+/-}- und R406W^{-/-}-Mäusen nach Färbung mit dem Antikörper Anti-Iba1

A-F Die Stereologie-basierte Quantifizierung Iba1-positiver Neurone erfolgte in den Regionen Frontalcortex (A,B), Parietalcortex (C,D) und Hippocampus (E,F). In keiner der untersuchten Regionen fand sich eine signifikante Veränderung der Anzahl an Mikroglia unter Behandlung mit Annonacin. Maßstabsbalken entspricht je 50 µm.

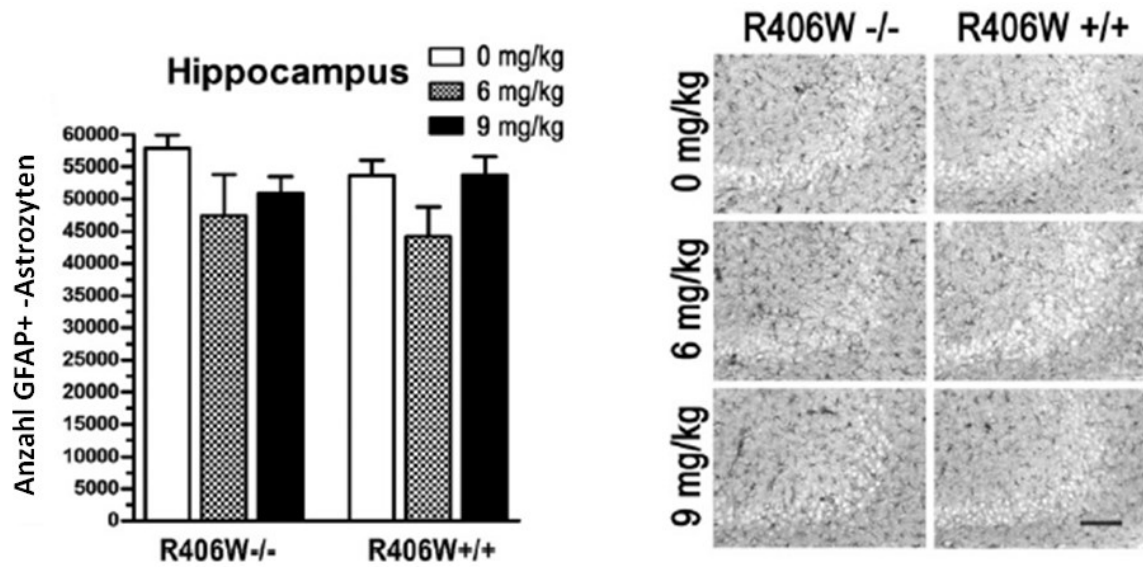


Abb. 13 Immunhistochemische Darstellung der Astrozyten in R406W^{+/-}- und R406W^{-/-}-Mäusen nach Färbung mit dem Antikörper Anti-GFAP

Die Quantifizierung GFAP-positiver Neurone erfolgte im Hippocampus. Im Bereich des Cortex kamen keine GFAP-positiven Neurone zur Darstellung. Im Hippocampus zeigte sich eine ähnlich hohe Zellzahl bei transgenen und nicht-transgenen Tieren. Ebenso zeigte sich keine Veränderung der Zellzahl unter Annonacinbehandlung. Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht, ob ein pathogenetischer Synergismus von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren in der Ätiologie der Tauopathien eine Rolle spielt.

Als Umwelttoxin diente dabei das prototypische Neurotoxin Annonacin, das als lipophiler Inhibitor des Komplex I der Atmungskette an der Entstehung von umweltbedingten Tauopathien beteiligt ist. Zur Klärung der Fragestellung wurden die Effekte einer Annonacinbehandlung auf Mäuse, die die längste humane Tau-Isoform mit der Punktmutation R406W exprimieren, untersucht.

4.1 Auswahl des Untersuchungsmodells

Die R406W-Mutation konnte in zahlreichen Familien mit hereditärer FTDP-17 nachgewiesen werden und ist mit einem klinisch und neuropathologisch heterogenen Erkrankungsspektrum assoziiert (siehe Tab. 3 der Einleitung). Die Expression von R406W-mutiertem humanem Tau in Mäusen führt zu einer neurodegenerativen Erkrankung, die der durch R406W-Mutation hervorgerufenen FTDP-17 im Menschen klinisch und neuropathologisch ähnelt und wurde daher als geeignetes Modell erachtet, um die Einflüsse genetischer und umweltbedingter Faktoren auf die Ausprägung von Tauopathien zu untersuchen (Tatebayashi et al., 2002).

Zhang et al. (2004) konnten zeigen, dass es in transgenen Mäusen mit R406W-Punktmutation zu einer altersabhängigen somatodendritischen Akkumulation von unlöslichen Tau-Filamenten kommt. Dieser Pool an unlöslichen Tau-Aggregaten wächst im Vergleich zu transgenen Tieren ohne R406W-Mutation (hWT-Tiere) mit zunehmendem Alter überproportional an und besteht nach 12 Monaten aus 21% des Gesamt-Tau-Proteins (im Vergleich zu 16% bei den hWT-Tieren). Zugleich konnte gezeigt werden, dass in ZNS-Axonon der R406W-Tiere ein wesentlich geringerer Anteil des Tau-Proteins an Mikrotubuli gebunden vorliegt im Vergleich zu hWT-Tieren und dass der langsame axonale Transport des Tau-Proteins in R406W-Tieren deutlich verzögert abläuft. Diese Verzögerung des axonalen Transports war besonders ausgeprägt im Alter von 6 Monaten zu beobachten. In 12-Monate-alten R406W-Tieren konnte bereits eine NFT-ähnliche Tauopathie im Bereich des

Hippocampus nachgewiesen werden, die neuropathologisch den NFTs im Hippocampus eines FTDP17-Patienten mit der gleichen R406W-Taumutation ähnelt (Zhang et al., 2004). Die in dieser Arbeit verwendeten R406W-Mäuse waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 16 bis 18 Wochen alt. Dies schien ein geeigneter Zeitpunkt für die Applikation des Neurotoxins, da die Tiere in diesem Alter noch keine ausgeprägte Taupathologie oder gar erkennbare Verhaltensauffälligkeiten entwickelt haben sollten und somit die Einflüsse des Neurotoxins auf die Pathologie am besten zu beurteilen sind.

In dem hier gewählten R406W^{+/+}-Mausmodell wurden den R406W^{+/+}-Mäusen, die sowohl endogenes Maus-Tau, als auch die längste humane Tau-Isoform mit R406W-Punktmutation exprimieren, R406W^{-/-}-Kontrollmäuse, die lediglich endogenes Maus-Tau exprimieren, gegenübergestellt. In den transgenen Tieren mit R406W-Punktmutation kommt es nicht nur zu einer beschleunigten Entstehung von NFT-ähnlichen Einschlüssen, sondern das Expressionsniveau des R406W-Taus liegt etwa 8- bis 10-fach über dem des endogenen Maus-Taus (Zhang et al., 2004). Eine besser geeignete Kontrollgruppe, um die Einflüsse der Annonacinbehandlung zu beurteilen, wäre daher eine transgene Maus, die humanes nicht-mutiertes Tau auf einem der R406W^{+/+}-Maus vergleichbaren Expressionsniveau exprimiert. Eine solche Vergleichsgruppe (human wildtyp Tau-Maus) stand jedoch für dieses Experiment nicht zur Verfügung.

Die Applikation des Annonacins erfolgte entsprechend vorangegangener *in vivo*-Studien in Ratten (Champy et al., 2004; Höglinger et al., 2003b) über subkutan implantierte Mini-Pumpen. Die Trägerlösung, beziehungsweise das Annonacin in Dosen von 6 und 9 mg/kg/d, wurde über eine Expositionszeit von drei Tagen verabreicht. Unter diesen Dosen lag die Mortalitätsrate der behandelten Tiere zwischen 6 und 13%. In der *in vivo*-Studie von Champy et al. zur Annonacin-Intoxikation in Ratten zeigten sich auch nach intravenöser Zufuhr von 7,6 mg/kg/d Annonacin über 28 Tage keine Zeichen einer systemischen Erkrankung oder gar erhöhte Mortalität in den untersuchten Tieren (Champy et al., 2004). Sowohl die unterschiedlichen Methoden der Verabreichung (subkutan versus intravenös), als auch die erhöhte Suszeptibilität von Mäusen gegenüber dem Toxin könnten ursächlich für die erhöhte Mortalität sein und rechtfertigen die im Vergleich zu der vorangegangenen Studie kurze Intoxikationszeit von drei Tagen. In diesem Versuchsaufbau führte bereits eine Dosis von 12 mg/kg/d Annonacin bei einer Expositionsdauer von drei Tagen zu einer Mortalitätsrate von 100%, so dass die maximal zu applizierende Annonacindosis niedriger

gewählt wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Annonacindosis zur subkutanen Intoxikation von Mäusen liegt über der durchschnittlichen oralen Annonacin-Ingestion eines Patienten mit atypischem Parkinsonismus auf Guadeloupe. Letztere entspricht einem durchschnittlichen Konsum von 10 Früchten, entsprechend 40-150 mg Annonacin pro Tag (Champy et al., 2005; Lannuzel et al., 2007). Für einen 70 kg schweren Erwachsenen liegt daher die durchschnittliche oral aufgenommene Annonacinmenge bei etwa 1,5 mg/kg/d. Obgleich die zur Intoxikation der Mäuse verwendeten Dosen diesen Wert bis zu 6-fach übersteigen, war die Mortalitätsrate in Anbetracht der kurzen Expositionsdauer vertretbar.

4.2 Neuropathologische Auswirkungen der Annonacinbehandlung

In den in dieser Arbeit verwendeten, nicht mit Annonacin behandelten R406W-Tieren zeigte sich nach immunhistochemischer Färbung mit Phospho-Tau-Antikörpern ein granuläres zytoplasmatisches Färbemuster ohne erkennbare fibrilläre Ablagerungen. Die Behandlung mit Annonacin führte zwar zu einer Zunahme an Phospho-Tau-positiven Neuronen, änderte jedoch nichts an dem Aspekt der homogenen Färbung innerhalb des Zytoplasmas. Obwohl sich in der Western Blot-Analyse der Gehirnhomogenate, die Gegenstand einer anderen Dissertation ist, eine Zunahme innerhalb der Sarkosyl-unlöslichen Fraktion des Gesamt- und Phospho-Tau-Proteins zeigte (Yamada et al., 2014, Fig. 4A), ergab sich hierfür nach immunhistochemischer Färbung kein morphologisches Korrelat im Sinne einer Ablagerung von NFTs. Ebenso wenig konnten in den mit Annonacin-behandelten Tieren vermehrter neuronaler Zelltod oder Astrogliose beobachtet werden. Somit handelt es sich bei den unter Annonacin-Exposition beobachteten Tauveränderungen am ehesten um frühe neuropathologische Veränderungen im Sinne eines *Pretangle*-Stadiums der Tauopathie. Die ultrastrukturelle Analyse der neuronalen Tauteseinschlüsse unter Anwendung von Elektronenmikroskopie oder weiterer Färbemethoden (z.B. Thioflavin S-Färbung) zur besseren Charakterisierung der Tauablagerungen ist in dieser Arbeit jedoch nicht erfolgt. Jedoch zeigten bereits vorangehende *in vitro*-Studien an fetalen striatalen Neuronen der Ratte, dass die nach Annonacinbehandlung zu beobachtende diffuse somatische Tauakkumulation nicht mit der Ausbildung von fibrillären Aggregaten einhergeht und daher

die Färbung der Zellen mit Thioflavin S nicht möglich ist (Escobar-Khondiker et al., 2007). *In vivo*-Studien an transgenen Mäusen, die humanes punktmutiertes Tau exprimieren, zeigen, dass das Auftreten von neurodegenerativen Veränderungen und kognitiven Defiziten nicht an das Vorhandensein von NFTs geknüpft ist, sondern dass die Expression des Transgens und die damit einhergehende Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau allein ausreichen, um einen Neuronenverlust hervorzurufen (Santacruz et al., 2005). Obwohl in der vorliegenden Arbeit weder die Ablagerung von NFTs, noch neuronaler Zelltod oder Astroglieose zu beobachten sind, reichte die kurze Annonacinbehandlung aus, um die unter Überexpression des Transgens zu erwartenden Tauveränderungen zu verstärken. Die unter alleiniger Expression von R406W-Tau zu erwartende pathologische Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau wurde durch die Annonacinbehandlung signifikant beschleunigt. *In vitro*-Studien an Primärkultur striataler Neurone demonstrieren, dass Annonacin bereits ab einer Konzentration von 50nM zu neuronalem Zelltod führt und eine Umverteilung des Tau-Proteins vom Axon in das Zellsoma durch aktiven retrograden Transport von Mitochondrien induziert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Effekte das Resultat einer Annonacin-induzierten ATP-Verarmung durch Komplex I-Inhibition der Zelle sind (Escobar-Khondiker et al., 2007). Die gleichen Effekte auf die zelluläre Taupathologie konnten unter Behandlung der Zellen mit zahlreichen weiteren natürlichen und synthetischen Komplex I-Inhibitoren beobachtet werden. Hierbei korrelierte die Fähigkeit der Neurotoxine eine Komplex I-Inhibition und damit ATP-Depletion der Zelle hervorzurufen mit ihrem Potential eine Umverteilung von Phospho-Tau in das somatodendritische Kompartiment und neuronalen Zelltod zu induzieren (Höllerhage et al., 2009). Diese und weitere Studien sprechen dafür, dass ein breites Spektrum an Umweltfaktoren durch Beeinflussung des zerebralen Energiemetabolismus an der Entstehung sporadischer Tauopathien beteiligt ist. Bei den in diesen *in vitro*-Modellen sporadischer Tauopathien verwendeten Zellen handelt es sich um fetale Neurone, die physiologischerweise stärker phosphoryliert sind als adulte Neurone (Goedert et al., 1993). Somit konnte unter Annonacineinfluss zwar eine Umverteilung von Phospho-Tau, jedoch kein messbarer Anstieg der Tau-Phosphorylierung, wie er in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, beobachtet werden (Escobar-Khondiker et al., 2007).

4.3 Mechanismen der Phospho-Tau-Akkumulation

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Annonacin-Exposition die Anzahl an Neuronen mit somatodendritischer Akkumulation von Phospho-Tau (AT180 und AT8) in R406W^{+/+}, nicht jedoch in R406W^{-/-}-Tieren, erhöht. Wie in den oben erwähnten fetalen *in vitro*-Modellen beschrieben (Escobar-Khondiker et al., 2007; Höllerhage et al., 2009), könnte dieser Effekt aus einer reinen Umverteilung von Phospho-Tau vom Axon in das somatodendritische Kompartiment resultieren. Ebenso könnte jedoch eine Zunahme des Tau-Proteins oder der Tauphosphorylierung die beobachtete Phospho-Tau-Akkumulation in diesem *in vivo*-Modell erklären. Um die letztgenannten Möglichkeiten genauer zu untersuchen, erfolgte die Western Blot-Analyse aus dem Hirngewebe der kontralateralen, das heißt der nicht für die Immunhistologie verwendeten Hirnhemisphäre der Mäuse. Deren Durchführung und Diskussion ist Gegenstand einer weiteren Dissertationsarbeit dieser Arbeitsgruppe. Mittels Western Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass es unter Annonacineinfluss zu einer Zunahme langer (humaner) und kurzer (Maus-) Tau-Isoformen in R406W^{+/+}, nicht jedoch in R406W^{-/-}-Mäusen kommt (Yamada et al., 2014, Fig. 4D,G). Diese Zunahme der Gesamtproteinmenge resultiert jedoch nicht aus einer Steigerung der Tau-Expression, denn die Bestimmung der mRNA-Level im kortikalem Gewebe mittels quantitativer PCR ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Annonacinbehandelten und Kontroll-Tieren (Yamada et al., 2014, Fig. 3 G,H). Gleiches zeigten bereits die vorangegangenen Zellkultur-Experimente von Escobar-Khondiker et al., in denen sich nach Annonacinbehandlung fetaler striataler Neurone eine Erhöhung der Gesamt-Tauproteinmenge, jedoch keine Erhöhung der mRNA-Menge nachweisen ließ (Escobar-Khondiker et al., 2007). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Zunahme des Tau-Proteins nicht durch eine Annonacin-induzierte Veränderung der Tauexpression zu erklären ist, sondern möglicherweise durch Beeinflussung posttranskriptioneller Mechanismen. So könnte eine Hemmung des Tau-Abbaus zu der beobachteten Annonacin-induzierten Akkumulation des Tau-Proteins beitragen.

Studien konnten zeigen, dass das Proteasom eine entscheidende Rolle im Abbau des Tau-Proteins und seiner Aggregate spielt (David et al., 2002). *In vitro* verhindert die Inhibition des proteasomalen Systems die Tau-Proteolyse und führt zur Stabilisierung pathologischer Proteinaggregate (Goldbaum et al., 2003). Ebenso sind einige familiäre neurodegenerative Erkrankungen mit Mutationen an Enzymen assoziiert, die für den Ubiquitin-abhängigen

proteasomalen Abbau von Proteinen essentiell sind (Leroy et al., 1998; Saigoh et al., 1999; Shimura et al., 2000). Diese Beobachtungen stützen die These, dass ein gestörter Proteinabbau durch das Proteasom an der Entstehung neurodegenerativer Veränderungen beteiligt ist.

Um zu untersuchen, ob Annonacin in diesem *in vivo*-Experiment den Proteinabbau durch das Proteasoms beeinflusst, erfolgte durch die Arbeit von Gesine Respondek die vergleichende Messung der proteolytischen Aktivität anhand der Spaltung fluorogener Peptidsubstrate in kortikalem Gewebe von Annonacinbehandelten (9 mg/kg/d) und Kontroll-Tieren in transgenen und nicht-transgenen Mäusen. Hierbei zeigte sich, dass in Annonacin-behandelten R406W^{+/+}-Tieren die chymotrypsinähnliche und die peptidylglutamyl-peptid-spaltende (PGPH) Aktivität des Proteasoms im Vergleich zu mit Trägerlösung behandelten Tieren signifikant reduziert ist. In den R406W^{-/-}-Tieren bestand hingegen kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Yamada et al., 2014, Fig. 3I). Da Annonacin zu einer Verminderung der proteolytischen Aktivität des Proteasoms führt, dessen Funktionsfähigkeit für den Tau-Abbau essentiell ist, scheint diese Verminderung des Proteinabbaus zu der beobachteten Annonacin-induzierten Tau-Akkumulation beizutragen.

Überraschenderweise konnten die Inhibition des Proteasoms und der konsekutive Tau-Proteinanstieg nach Annonacinexposition jedoch nur in der Gruppe der transgenen Mäuse beobachtet werden. In der Western Blot-Analyse ubiquitinierter Proteine aus kortikalem Gewebe transgener und nicht-transgener Tiere (Untersuchung der Behandlungsgruppen 0 und 9 mg/kg/d Annonacin) fand sich jedoch sowohl bei den R406W^{+/+}- als auch bei den R406W^{-/-}-Mäusen eine unter Annonacinexposition zunehmende Menge ubiquitinierter Proteine (Yamada et al., 2014). Diese Beobachtung ist kongruent zu den Ergebnissen der *in vitro*-Studie von Höglinger et al., die zeigen konnte, dass die Exposition mesencephaler Neurone gegenüber Komplex I-Inhibitoren durch vermehrte ROS-Produktion (*reactive oxygen species*, ROS) zu einer Akkumulation oxidativ veränderter Proteine und verminderter Proteolyse führt (Höglinger et al., 2003a). Anhand der Ergebnisse zeigt sich, dass die Komplex I-Inhibition oxidativen Stress bewirkt, in dessen Folge es zur Anhäufung beschädigter Proteine kommt, die über das Proteasom abgebaut werden müssen. Dieser Effekt scheint somit unabhängig vom Genotyp der Zellen aufzutreten.

Eine mögliche Erklärung dafür, warum Tau-Akkumulation und Proteasom-Inhibition in unserem Experiment lediglich in den R406W^{+/+}-Tieren zu finden sind, könnte die

unterschiedliche Belastung des proteasomalen Systems in transgenen und nicht-transgenen Tieren sein. Während die Anhäufung beschädigter Proteine, die durch die Behandlung mit 9 mg Annonacin entsteht, offenbar durch das Proteasom noch bewältigt werden kann, führt die zusätzliche Proteinbelastung in Form des mutierten Taus in den transgenen Tieren zu einer Proteinüberladung der Zelle und einer Überschreitung der proteasomalen Kapazität die anfallenden Proteine abzubauen.

Obwohl die intrazelluläre Ablagerung von phosphoryliertem Tau als zellschädigend gilt, gibt es einige Studien, die den Ablagerungen eine protektive Wirkung gegenüber toxischen Einflüssen zuschreiben. Santacruz et al. zeigten, dass es unter Suppression der Tau-Expression im transgenen Mausmodell zu einer Verbesserung der Gedächtnisfunktion und Stabilisierung der Neuronenzahl kommt, die Akkumulation von NFTs jedoch anhält (Santacruz et al., 2005). Gegen die Neurotoxizität der unlöslichen Tauaggregate spricht zudem die Dissoziation zwischen der Anzahl an NFTs und dem Ausmaß des neuronalen Zelltodes, die in dieser und weiteren Studien beobachtet wurde (Andorfer et al., 2005; Santacruz et al., 2005). Während eine neurotoxische Wirkung durch Ablagerung von Proteinfilamenten somit nicht hinreichend belegt ist, konnten Studien eine Assoziation zwischen Tau-Hyperphosphorylierung und Tau-vermittelter Zytotoxizität nachweisen (Fath et al., 2002).

Bezüglich der Auswirkungen von Taumutationen auf den Phosphorylierungszustand des Taumoleküls existieren einige Studien mit zum Teil diskrepanten Ergebnissen. Studien in Zellkultur konnten zeigen, dass R406W-punktmutiertes Tau weniger phosphoryliert ist als Wildtyp-Tau. Dies betrifft insbesondere die Aminosäurereste Serin 396 und Serin 404, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu der Punktmutation liegen (Perez et al., 2000). Dem widersprechen Studien, in denen R406W-mutiertes Tau an Position Serin 396 bis zu 4-fach stärker und 12-mal schneller phosphoryliert wird als Wildtyp-Tau (Alonso Adel et al., 2004). Diese Hyperphosphorylierung konnten auch *in vivo*-Studien an R406W-mutierten Mäusen nachweisen, in denen mutiertes Tau ebenfalls an zahlreichen Aminosäureresten, einschließlich Serin 396, phosphoryliert vorlag (Tatebayashi et al., 2002). Gleiches konnte für einige andere Taumutationen (P301L, V337M) belegt werden (Gotz et al., 2001; Tanemura et al., 2002). Durch die Mutationen kommt es zu einer Veränderung der Konformation des Taumoleküls, die offenbar die Hyperphosphorylierung durch Tau-Kinasen begünstigt (Alonso Adel et al., 2004). Unabhängig von den unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich des

Phosphorylierungsgrades des mutierten Taus konnten diese Studien zeigen, dass das phosphorylierte, mutierte Tauprotein seine Fähigkeit an Mikrotubuli zu binden und diese zu stabilisieren verliert und somit im Zytoplasma akkumuliert (Alonso Adel et al., 2004; Perez et al., 2000). Um die Zusammenlagerung der Tau-Moleküle zu initiieren ist im Falle von mutiertem Tau ein wesentlich geringerer Zusatz von Phosphat notwendig als für die Aggregation von Wildtyp-Tau (Alonso Adel et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter Behandlung der R406W^{+/+}-Tiere mit Annonacin zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg an hyperphosphoryliertem Tau an den Bindungsstellen AT8 und AT180 kommt. Dieser Anstieg an Phospho-Tau wird jedoch nicht hinreichend durch einen Anstieg der Gesamt-Tauproteinmenge erklärt. So zeigte die Western Blot-Analyse von Gesine Respondek, dass die unter Annonacin beobachtete Zunahme an phosphoryliertem Tau die ebenfalls beobachtete Zunahme der Gesamttauproteinmenge signifikant übersteigt (Yamada et al., 2014). Dies lässt auf die Aktivierung von Tau-Kinasen schließen, die unter Annonacineinfluss zu der beobachteten Tau-Hyperphosphorylierung beitragen.

Die Gruppe an Tau-Kinasen, die an der *in vitro*-Phosphorylierung des Tau-Proteins beteiligt sind, ist groß und diente der Identifizierung zahlreicher Tau-Phosphorylierungsstellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Eine Übersicht über die phosphorylierten Aminosäurereste in Alzheimer- und PSP-Tau und gesunden Kontrollen, sowie über die *in vitro*-Phosphorylierungsstellen der Tau-Kinasen, liefert die Arbeit von Hanger (Hanger et al., 2009). Anhand der Übersicht (<http://cnr.iop.kcl.ac.uk/hangerlab/tautable>) wird deutlich, dass die Mehrzahl der Phosphorylierungsstellen durch viele verschiedene Tau-Kinasen phosphoryliert werden können, ebenso wie eine Kinase in der Regel mehrere Stellen phosphoryliert. Um herauszufinden welche der Kinasen an der in dieser Arbeit beobachteten Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins beteiligt sein könnten, erfolgte die Untersuchung der Kinasen, die Tau an den AT8- und AT180-reaktiven Aminosäureresten phosphorylieren. Zu diesen Kinasen gehören unter anderem die cyclin-dependent kinase 5 (cdk5), die cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA), die Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), die p42/p44 mitogen-activated protein kinases (ERKs 1/2), die p38 mitogen-activated kinase (p38MAPK) und die Stress-activated protein kinase (SAPK). Für vier dieser Kinasen (SAPK, Erk 1/2, GSK-3β, cdk5) erfolgte die Western Blot-Analyse unter Verwendung von Proteinextrakten des Frontalcortex. Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere die Prolin-gerichteten

Serin/Threonin-Kinasen GSK-3 β und cdk5 an der beobachteten Hyperphosphorylierung in den R406W^{+/+}-Tieren beteiligt sein könnten (Yamada et al., 2014).

Unter Annonacinbehandlung der R406W^{+/+}-Tiere zeigte sich eine Erhöhung der Proteinmenge der GSK-3 β unter der höheren Annonacindosis (9 mg/kg/d), während in den R406W^{-/-}-Tieren kein Unterschied nachweisbar war (Yamada et al., 2014, Fig. 5D). Dieses Ergebnis korreliert mit dem AT180/Tau5-Verhältnis, das in dieser Behandlungsgruppe ebenfalls erhöht ist (Fig. 4H). Somit könnte die GSK-3 β für die unter Annonacinbehandlung beobachtete Zunahme der Tauphosphorylierung an dem AT180-reaktiven T231-Epitop des Tau-Proteins verantwortlich sein. Für die Gruppe der R406W^{+/+}-Tiere, die mit 6 mg/kg Annonacin behandelt wurden, konnte keine signifikante Zunahme der GSK-3 β nachgewiesen werden. Die Untersuchung der phosphorylierten GSK-3 β zeigte, dass für diese Behandlungsgruppe eine Zunahme der aktivierten (phospho(Y216)-GSK-3 β) wie auch der inaktivierten (phospho(S9)-GSK-3 β) Form der GSK-3 β nachweisbar ist (Yamada et al., 2014, Fig. 5 E, F). Jedoch konnte auch unter höherer Annonacindosis (9 mg/kg/d) kein Anstieg der aktivierten GSK-3 β beobachtet werden. Bezüglich der cdk5 zeigte sich sowohl in den R406W^{+/+}-, als auch in den R406W^{-/-}-Tieren ein dosisabhängiger Anstieg der Proteinmenge (Yamada et al., 2014, Fig. 5G). Die Aktivierung der cdk5 erfordert jedoch die Assoziation mit den Aktivatorproteinen p35 oder p39. Durch proteolytische Spaltung von p35 entsteht p25, das nach Zusammenlagerung mit cdk5 zur Überaktivierung der Kinase führt (Cheung und Ip, 2012). Eine durch p25 vermittelte prolongierte Aktivierung der cdk5 wurde im Tiermodell in direkten Zusammenhang mit der Hyperphosphorylierung von Tau und der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen gebracht (Cheung und Ip, 2004). In dem Experiment unserer Arbeitsgruppe konnte ein selektiver Anstieg des p25/p35-Verhältnisses in den mit Annonacin behandelten R406W^{+/+}-Tieren beobachtet werden. Der p25/p35-Quotient war in diesen Tieren um das 10- (6mg/kg Annonacin) bzw. 20-fache (9mg/kg Annonacin) erhöht (Yamada et al., 2014, Fig. 5H-J). Diese Ergebnisse sind kongruent zu dem Anstieg des AT8/Tau5-Verhältnisses in diesen Behandlungsgruppen, was für eine mögliche Beteiligung der cdk5 an der Phosphorylierung der AT8-reaktiven S202/T205-Epitope spricht. Eine Aktivierung der beiden Kinasen GSK-3 β und cdk5 könnte somit zu der unter Annonacin-Intoxikation beobachteten Hyperphosphorylierung in den R406W^{+/+}-Tieren beitragen.

Die besondere Rolle dieser beiden Serin/Threonin-Kinasen bei der abnormen Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins im Rahmen verschiedener Tauopathien,

insbesondere der Alzheimer-Erkrankung, konnte in zahlreichen Studien belegt werden (Plattner et al., 2006; Sengupta et al., 1997). Die Studiendaten sprechen für eine funktionelle Assoziation zwischen beiden Kinasen, die das Ausmaß der Tauphosphorylierung beeinflusst. So konnten Sengupta et al. zeigen, dass die Aktivität der GSK-3 β stimuliert wird, wenn Tau zuvor durch die cdk5 phosphoryliert wurde. Die Phosphorylierung durch die cdk5 erhöht Rate und Ausmaß der nachfolgenden Phosphorylierung durch die GSK-3 β . Dies betrifft besonders die AT180-Bindungsstelle Threonin 231, die bis zu 9-fach stärker phosphoryliert ist (Sengupta et al., 1997). Unter Zufuhr hoher Annonacindosen zeigte sich eine Zunahme beider Kinasen, sowie eine signifikante Zunahme der AT180-Immunantwort (Yamada et al., 2014; Fig. 4H und 5).

In zahlreichen Studien wird die cdk5 als bedeutender Regulator der GSK-3 β -Aktivität beschrieben (Hallows et al., 2003; Plattner et al., 2006; Wen et al., 2008). Plattner et al. konnten in ihrer *in vivo*-Studie zeigen, dass die beiden Kinasen in einem funktionellen Komplex vorliegen, wobei die cdk5 die Aktivität der GSK-3 β reguliert und ausschließlich darüber die Phosphorylierung des Tau-Proteins zu beeinflussen mag. Während in ihrem Experiment die p25-vermittelte Überaktivierung der cdk5 in jungen transgenen Mäusen zu einer Inhibition der GSK-3 β führte, ging diese inhibitorische Kontrolle in alten transgenen Mäusen verloren. Der Verlust der inhibitorischen Regulation und die daraus folgende GSK-3 β -Aktivierung korrelierten mit der Hyperphosphorylierung der AT-8- und PHF-1-Bindungsstellen in den alten transgenen Tieren (Plattner et al., 2006). Diese Abnahme der GSK-3 β -Inhibition in älteren Mäusen aufgrund verminderter Phosphorylierung an GSK-3 β -Serin-9 und der konsekutive Anstieg der Phospho-Tau-Level konnte durch Wen et al. bestätigt werden. Zudem führte die Behandlung junger transgener Tiere mit cdk5-Inhibitoren aufgrund aufgehobener GSK-3 β -Inhibition zu einem Anstieg der Tau-Phosphorylierung (Wen et al., 2008). Überträgt man diese Ergebnisse auf die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, könnte dies bedeuten, dass nicht die cdk5 selbst die Tauphosphorylierung an den AT8-reaktiven Epitopen vermittelt, sondern, dass der beobachtete Anstieg des p25-Proteins mit einem Verlust der inhibitorischen Kontrolle der cdk5 über die GSK-3 β einhergeht und letztere direkt die Tauhyperphosphorylierung an den AT8-Bindungsstellen vermittelt. In diesem Fall käme der GSK-3 β eine Schlüsselfunktion in der Tauphosphorylierung zu, während die cdk5 lediglich als Modulator der Tauphosphorylierung, vermittelt über die inhibitorische Regulation der GSK-3 β , agiert. Um jedoch die exakten

Mechanismen zu verstehen, die in Folge der Annonacinbehandlung in Gang gesetzt werden und zu einer Tau-Hyperphosphorylierung führen, sind weitere Studien erforderlich.

4.4 Relevanz einer Exposition gegenüber Umwelttoxinen

Da Annonacin und verwandte Acetogenine ausschließlich aus Pflanzen der Annonaceae-Familie gewonnen werden können und diese lediglich in tropischen und subtropischen Gebieten beheimatet sind, ist eine Exposition gegenüber diesen Toxinen außerhalb der Tropen nicht relevant. Insbesondere die Exposition von Trägern der R406W-Mutation, die aus Nordamerika, Nordeuropa und Japan stammen, erscheint unwahrscheinlich. Jedoch konnten zahlreiche weitere lipophile Komplex I-Inhibitoren pflanzlichen, mikrobiellen und synthetischen Ursprungs identifiziert werden, die *in vitro* eine Tauopathie induzieren. Höllerhage et al. testeten 24 verschiedene Komplex I-Inhibitoren unterschiedlicher Potenz, die alle die zellulären ATP-Level reduzierten, neuronalen Zelltod induzierten und zu einer Umverteilung von phosphoryliertem Tau vom Axon in das Zellsoma führten (Höllerhage et al., 2009). Unter den untersuchten Substanzen besitzen die Pestizide Rotenon und Fenazaquin und die durch *Streptomyces* spp. produzierten Piericidine aufgrund ihrer globalen Verbreitung eine größere Relevanz als die lokal verbreiteten Acetogenine. So findet Fenazaquin weltweite Anwendung in der Landwirtschaft (Kumar et al., 2006). Die in der Europäischen Union zugelassenen Grenzwerte für eine Fenazaquin-Kontamination von Obst und Trinkwasser liegen nahe den Konzentrationen, die *in vitro* zu Zelltod und einer Tau-Umverteilung führten. Auch das deutlich potentere Rotenon war, bis es 2007 vom europäischen Markt genommen wurde, in noch höheren Konzentrationen zugelassen als Fenazaquin und ist in den USA weiterhin erhältlich (Höllerhage et al., 2009). In Ratten führte die chronisch systemische Intoxikation mit Rotenon ebenfalls zur Induktion einer Tauopathie (Höglinger et al., 2005). Über die Bioverfügbarkeit im Menschen nach Ingestion oder Inhalation von Rotenon existieren jedoch keine genauen Daten.

Eine weitere potentielle Quelle für die chronische Intoxikation mit Komplex I-Inhibitoren stellt die Kontamination von Nahrungsmitteln durch Bakterien oder ihre toxischen Produkte dar. So können Myxobakterien ebenso wie *Streptomyces*-Bakterien hoch potente Komplex I-Inhibitoren produzieren und kommen ubiquitär im Erdboden vor. Die durch *Streptomyces*

spp. produzierten Piericidine gehören *in vitro* zu den potentesten Auslösern von neuronalem Zelltod und Tau-Umverteilung (Höllerhage et al., 2009).

Dass die Komplex I-Inhibition bezüglich der Entstehung humaner neurodegenerativer Erkrankungen relevant ist, zeigt sich nicht nur am Beispiel des lokal auftretenden Annonacin-assoziierten atypischen Parkinsonismus, sondern auch anhand wesentlich häufiger auftretender neurodegenerativer Erkrankungen, die auch außerhalb einer spezifischen Umgebung mit bekanntem Expositionsrisiko auftreten.

Epidemiologische Studien, die die Relevanz von Umweltfaktoren in der Genese der Parkinson-Krankheit (PD) untersuchen, konnten zeigen, dass ländliche Lebensweise und der Gebrauch von Pestiziden und Herbiziden das Risiko für die Entwicklung einer PD erhöhen (Warner and Schapira, 2003). In post-mortem Untersuchungen an Patienten mit PD wurde eine verminderte Komplex I-Aktivität in der Substantia nigra nachgewiesen (Schapira et al., 1989). Im Tiermodell des Parkinsonismus konnte die Komplex I-Inhibition durch Anwendung von MPP⁺ (1-Methyl-4-phenylpyridinium) erreicht werden. MPP⁺ ist ein Metabolit des Neurotoxins MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), das bei unsachgemäßer Herstellung der Designerdroge MPPP (1-Methyl-4-phenyl-4-propion-oxy-piperidin) entsteht, und ist in der Lage in Mensch und Tier Neurodegeneration und Parkinsonismus zu induzieren (Langston et al., 1983). Zudem führte die chronisch-systemische Zufuhr von Rotenon in Ratten zum Verlust dopaminerger Zellen, zur Ausbildung von α -Synuclein-haltigen Aggregaten sowie den klinischen Symptomen des Parkinsonismus (Betarbet et al., 2000; Höglinger et al., 2003b).

Eine ähnliche Bedeutung wurde der mitochondrialen Dysfunktion in der Genese der PSP zugeschrieben (Albers and Beal, 2002; Chirichigno et al., 2002). Untersuchungen an Cybrid-Zelllinien, die mitochondriale Gene von PSP-Patienten exprimieren, zeigten eine verminderte Komplex I-Aktivität, sowie eine erhöhte Aktivität antioxidierender Enzyme in PSP-Cybriden im Vergleich zu Kontrollen (Swerdlow et al., 2000). Zudem konnte die *in vivo*-Studie von Stamelou et al. eine Verarmung an zerebralen Energiemetaboliten in den vulnerablen Gehirnregionen von PSP-Patienten (Basalganglien und Frontalcortex) nachweisen, die unabhängig von neuronalem Zelltod auftritt und auf eine gestörte mitochondriale ATP-Produktion zurückzuführen ist (Stamelou et al., 2009). Für eine mitochondriale Dysfunktion spricht auch die Beobachtung, dass nach oraler Einnahme von Coenzym Q10, einem physiologischen Kofaktor des Komplex I der Atmungskette, eine Verbesserung des

Energiemetabolismus und der klinischen Symptomatik bei den untersuchten PSP-Patienten zu beobachten ist (Stamelou et al., 2008).

Ebenso spielen Defekte der Atmungskette in der Genese zahlreicher weiterer Erkrankungen eine Rolle. Zu diesen gehören die Chorea Huntington (Lodi et al., 2000), die Friedreich-Ataxie (Bradley et al., 2000), die fokale Dystonie, sowie die Lebersche Optikusatrophie (LHON) (Schapira, 1998). Die Mechanismen für das Auftreten einer mitochondrialen Dysfunktion in den verschiedenen Erkrankungen sind jedoch so unterschiedlich wie die Erkrankungen selbst. Im Falle der Friedreich-Ataxie tritt die mitochondriale Dysfunktion primär in Folge einer Genmutation, die die Expression des mitochondrialen Proteins Frataxin beeinflusst, auf (Bradley et al., 2000). Bei der Chorea Huntington findet sich der gestörte mitochondriale Metabolismus jedoch als sekundäres Phänomen, das unabhängig von der zugrundeliegenden Tripletexpansion zur Pathogenese beiträgt (Lodi et al., 2000). Für die PD hingegen ist die primäre und sekundäre mitochondriale Dysfunktion beziehungsweise Komplex I-Defizienz beschrieben (Schapira, 2008). Insgesamt ist die mitochondriale Dysfunktion, ob primär oder sekundär, jedoch nur für einen Teil der Erkrankungsfälle verantwortlich. So kann bei etwa 25% der Patienten mit PD prä- oder postmortem ein signifikanter Komplex I-Defekt nachgewiesen werden (Schapira, 2010).

Vor diesem Hintergrund finden sich Komplex I-Inhibitoren nur in sehr begrenzten Fällen als alleinige Verursacher neurodegenerativer Erkrankungen, wie die Beispiele des MPTP-Parkinsonismus und des atypischen Parkinsonismus auf Guadeloupe zeigen. Wesentlich häufiger scheinen sie jedoch zusammen mit genetischen Faktoren und weiteren Umweltfaktoren zur Pathogenese der Erkrankungen beizutragen. Die klinischen und neuropathologischen Auswirkungen einer Komplex I-Inhibition sind vermutlich von zahlreichen Kovariablen abhängig. So spielen nicht nur die Toxindosis, sondern auch Mechanismen der zellulären Aufnahme und Elimination von Neurotoxinen, sowie das Vorhandensein einer genetischen Prädisposition eine Rolle. Während zahlreiche genetische Risikofaktoren bereits bekannt sind, existieren noch keine Daten zu Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Elimination der Komplex I-Inhibitoren im Menschen (Höllerhage et al., 2009).

4.5 Relevanz der Arbeit und Ausblick

Dass ein Zusammenwirken intrinsischer und extrinsischer Faktoren für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, beziehungsweise Tauopathien, relevant ist, bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, die zeigen, dass ein Umweltfaktor in der Lage ist den genetisch determinierten Verlauf einer Erkrankung zu verändern. So reichte die dreitägige Exposition gegenüber Annonacin aus, um die Tau-Phosphorylierung und die somatodentritische Akkumulation von Phospho-Tau in R406W-transgenen Mäusen zu erhöhen. Mit Hilfe dieses Modells gelang erstmalig der *in vivo* Nachweis einer Annonacin-induzierten Tau-Hyperphosphorylierung. Das Auftreten sporadischer Tauopathien sowie die phänotypische Heterogenität der FTDP-17 legten die Vermutung nahe, dass Umweltfaktoren die Entstehung der Erkrankung entscheidend beeinflussen. Diese Hypothese konnte anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Sie zeigt exemplarisch, inwieweit der Einfluss des Umweltfaktors Annonacin die Ausprägung der Tau-Pathologie zu beeinflussen vermag und demonstriert, dass eine genetische Prädisposition die Vulnerabilität gegenüber extrinsischen Faktoren im Sinne einer Zunahme neuropathologischer Veränderungen zu erhöhen vermag. Obgleich eine Exposition gegenüber Annonacin aufgrund von dessen lokaler Verbreitung begrenzte Relevanz besitzt, könnte dieses *in vivo*-Modell dazu dienen, weitere global verbreitete Komplex I-Inhibitoren, für die eine Exposition des Menschen realistisch erscheint (Höllerhage et al., 2009), zu untersuchen. Darüber hinaus dient das Modell als Grundlage für die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die durch die Exposition gegenüber Umwelt- und genetischen Faktoren in Gang gesetzt werden und zu der beobachteten Tau-Pathologie führen. So konnte durch unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die Annonacin-Exposition in den R406W^{+/+}-Tieren zu einer Hemmung des Tau-Abbaus über das Proteasom sowie einer Aktivierung von Tau-Kinasen führt und so die beobachtete Akkumulation von Phospho-Tau induziert. Diese Erkenntnisse sind wiederum essentiell im Hinblick auf die Entwicklung therapeutischer Strategien.

In vitro- und *in vivo*-Studien mit Tau-Kinase-Inhibitoren lassen darauf schließen, dass diese in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen von Nutzen sein könnten. So vermochte die orale Zufuhr des GSK-3 β -Inhibitors Tideglusib die Neurogenese im Gyrus dentatus adulter Ratten zu induzieren (Morales-Garcia et al., 2012). Inzwischen wurde Tideglusib in einer multinationalen Phase-II-Studie (Tau Restoration on PSP (TAUROS)- Studie) hinsichtlich seiner Effizienz und Verträglichkeit in der Behandlung von Patienten mit PSP untersucht

(Tolosa et al., 2014). Trotz guter Verträglichkeit konnte nach einjähriger Behandlung mit Tideglusib keine Verbesserung der klinischen Symptome in den Patienten mit milder bis moderater PSP beobachtet werden. In einer MRI-Substudie zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion der Hirnatrophie in den mit Tideglusib behandelten Patienten im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Höglinger et al., 2014). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass Tideglusib in der Lage ist, die Progression der PSP zu verlangsamen. Ob Tideglusib und andere Tau-Kinase-Inhibitoren als Therapeutika zur Behandlung der PSP und anderer Tauopathien Anwendung finden werden und zu einer messbaren Symptomlinderung in den betroffenen Patienten führen können, werden zukünftige Studien zeigen.

5 Zusammenfassung

Auf der Suche nach Interaktionen zwischen Genen und Umwelt, die zu einem pathogenetischen Synergismus führen, wurden in dieser Arbeit die neuropathologischen Effekte einer *in vivo*-Intoxikation mit dem prototypischen Komplex I-Inhibitor Annonacin im transgenen FTDP-17-Mausmodell untersucht. Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, ob Annonacin *in vivo* zu einer neuronalen Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau, dem charakteristischen Merkmal der FTDP-17 und anderer Tauopathien, führt. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die beobachteten Effekte des Annonacins durch das Vorliegen einer Genmutation verstärkt werden und mit neuronalem Zellverlust und Astroglieose einhergehen. Zur Klärung der Fragestellung wurden Mäuse, die die längste humane Tau-Isoform mit der R406W-Punktmutation exprimieren, sowie Wildtyp-Mäuse über drei Tage mittels subkutan implantierter Minipumpen mit Annonacin (6 mg/kg/d oder 9 mg/kg/d) oder einer Trägerlösung behandelt. Im Anschluss erfolgte die immunhistochemische Darstellung von phosphoryliertem Tau, sowie von Neuronen und Gliazellen im Hirngewebe der Tiere. Mittels stereologischer Methoden und optischer Dichtemessung wurden die Neurone und Gliazellen in verschiedenen Hirnregionen (Frontalcortex, Parietalcortex, Hippocampus und Amygdala) quantifiziert. Bereits unter alleiniger Expression des Transgens konnte im Vergleich zum Wildtyp eine somatodendritische Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau in allen untersuchten Hirnregionen nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau in den R406W^{+/+}-Tieren unter Annonacinexposition konzentrationsabhängig zunimmt, während in den R406W^{-/-}-Tieren kein Unterschied nachweisbar ist. Diese Zunahme der Tau-Pathologie ließ sich im Frontalcortex- und Parietalcortex anhand einer Zunahme Phospho-Tau positiver Neurone und im Hippocampus anhand einer vermehrten optischen Dichte dieser Neurone in der CA2/3-Region nachweisen. Die Quantifizierung Tau-positiver Neurone in der Amygdala ergab jedoch keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Die immunhistochemische Darstellung der Neurone mittels NeuN-Antikörpern konnte eine signifikant niedrigere Neuronenzahl in allen untersuchten Hirnregionen der R406W^{+/+}-Tiere im Vergleich zu den R406W^{-/-}-Tieren nachweisen. Die Annonacinbehandlung führte jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung der Neuronenzahl in den Untersuchungsgruppen. Ebenso blieb

die Anzahl an Astro- und Mikroglia in transgenen und Wildtyp-Tieren unter Annonacinexposition unverändert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die dreitägige Exposition gegenüber Annonacin ausreicht, um in R406W-transgenen Mäusen eine somatodendritische Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau zu induzieren, die in Abhängigkeit von der Annonacindosis zunimmt. Dies zeigt exemplarisch, dass ein Umwelttoxin in der Lage ist, den genetisch determinierten Verlauf einer Tauopathie zu verändern, indem es synergistisch mit dem Gendefekt die Tauopathie verstärkt. Die Erforschung der Relevanz weiterer, global verbreiteter Umwelttoxine in der Genese der Tauopathien sowie der genauen Mechanismen, die zu einer Tau-Pathologie führen, sollte Gegenstand weiterer Studien sein und wird essentiell zum Verständnis der Neuropathogenese und zur Entwicklung therapeutischer und prophylaktischer Strategien in der Behandlung von Tauopathien beitragen. Das hier verwendete FTDP-17-Tiermodell kann zur Beantwortung dieser Fragen in Folgestudien Anwendung finden und so Erkenntnisse liefern, die möglicherweise auch auf andere Tauopathien hereditären oder sporadischen Ursprungs übertragbar sind.

6 Summary

Searching for gene-environment interactions leading to pathogenic synergy, this thesis examines the neuropathological effects of an intoxication with the prototypical complex I inhibitor annonacin in a transgenic FTDP-17 mouse model. This work aimed to test, whether annonacin leads to a neuronal accumulation of hyperphosphorylated tau *in vivo*, which is the characteristic hallmark of FTDP-17 and other tauopathies. Furthermore it aimed to resolve, whether the interaction of annonacin and a genetic factor leads to an increase in tau pathology and whether treatment with annonacin is accompanied by neuronal death and microglial reaction. To clarify these questions we treated mice overexpressing the longest human tau isoform with the R406W mutation and wildtype mice with annonacin (6 mg/kg/d or 9 mg/kg/d) or vehicle via subcutaneous administration with osmotic mini-pumps for a three-day period. Thereafter immunohistochemical staining of the brain tissue was done with antibodies against phosphorylated tau, neurons and glial cells. Quantification of neurons and glial cells in the different brain regions (frontal and parietal cortex, hippocampus, amygdala) was conducted by stereological cell counting and optical density measurement. In comparison to wildtype mice, the expression of the transgene in R406W^{+/+} mice was sufficient to cause somatodendritic accumulation of hyperphosphorylated tau. Administration of annonacin led to a dose-dependent increase of somatodendritic phospho-tau accumulation in R406W^{+/+} mice, while there was no effect in R406W^{-/-} mice. This increase in tau pathology was determined by an increase of phospho-tau positive neurons in the frontal and parietal cortex and by an increased optical density of phospho-tau positive neurons in the CA2/3 region of the hippocampus. In the amygdala, annonacin exposure had no significant additional effect on phospho-tau labeling. Immunohistochemical staining of neurons using the anti-NeuN antibody revealed that there is a significantly lower number of neurons in all brain regions examined in R406W^{+/+} mice as compared to R406W^{-/-} mice. However annonacin treatment had no significant influence on neuronal numbers in the different treatment groups and genotypes. In the same way, annonacin did not cause significant alteration in the number of microglia or astrocytes of either transgenic or wildtype mice.

In summary, this work has shown that a three-day exposure with annonacin is sufficient to

cause a dose-dependent increase of somatodendritic accumulation of phospho-tau in R406W-transgenic mice. This demonstrates that an environmental toxin is able to change the course of a tauopathy determined by a genetic factor by increasing tau pathology in synergism with the genetic defect. It should be the aim of further studies to elucidate the relevance of further globally distributed environmental toxins in the pathogenesis of tauopathies as well as the exact mechanisms which lead to tau pathology. This knowledge will be essential for the understanding of the pathogenesis of these diseases and for the development of prophylactic and therapeutic strategies for the treatment of tauopathies. The FTDP-17 mouse model used in this study can be applied in further studies and might give insights, which are relevant not only for FTDP-17 but also for other tauopathies of genetic or sporadic origin.

7 Literaturverzeichnis

Aamodt, E.J., and Williams, R.C., Jr. (1984). *Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro*. Biochemistry 23, 6023-6031.

Albers, D.S., and Beal, M.F. (2002). *Mitochondrial dysfunction in progressive supranuclear palsy*. Neurochem Int 40, 559-564.

Alonso, A.C., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). *Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules*. Nat Med 2, 783-787.

Alonso Adel, C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2004). *Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations*. J Biol Chem 279, 34873-34881.

Amos, L.A. (2004). *Microtubule structure and its stabilisation*. Org Biomol Chem 2, 2153-2160.

Andorfer, C., Acker, C.M., Kress, Y., Hof, P.R., Duff, K., and Davies, P. (2005). *Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms*. J Neurosci 25, 5446-5454.

Andreadis, A., Brown, W.M., and Kosik, K.S. (1992). *Structure and novel exons of the human tau gene*. Biochemistry 31, 10626-10633.

Angibaud, G., Gaultier, C., and Rascol, O. (2004). *Atypical parkinsonism and Annonaceae consumption in New Caledonia*. Mov Disord 19, 603-604.

Arai, T., Ikeda, K., Akiyama, H., Nonaka, T., Hasegawa, M., Ishiguro, K., Iritani, S., Tsuchiya, K., Iseki, E., Yagishita, S., et al. (2004). *Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration*. Ann Neurol 55, 72-79.

Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., and Hyman, B.T. (1992). *Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease*. Neurology 42, 631-639.

Baker, M., Litvan, I., Houlden, H., Adamson, J., Dickson, D., Perez-Tur, J., Hardy, J., Lynch, T., Bigio, E., and Hutton, M. (1999). *Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive*. Hum Mol Genet 8, 711-715.

Ballatore, C., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2007). *Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders*. In Nat Rev Neurosci (England), pp. 663-672.

Barghorn, S., Zheng-Fischhofer, Q., Ackmann, M., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). *Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias*. Biochemistry 39, 11714-11721.

Beharry, C., Cohen, L.S., Di, J., Ibrahim, K., Briffa-Mirabella, S., and Alonso Adel, C. (2014). *Tau-induced neurodegeneration: mechanisms and targets*. Neurosci Bull 30, 346-358.

Bennecib, M., Gong, C.X., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001). *Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356*. In FEBS Lett (Netherlands), pp. 15-22.

- Berriman, J., Serpell, L.C., Oberg, K.A., Fink, A.L., Goedert, M., and Crowther, R.A. (2003). *Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure*. In Proc Natl Acad Sci U S A (United States), pp. 9034-9038.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., and Greenamyre, J.T. (2000). *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nat Neurosci 3, 1301-1306.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985). *The distribution of tau in the mammalian central nervous system*. J Cell Biol 101, 1371-1378.
- Bondareff, W., Wischik, C.M., Novak, M., Amos, W.B., Klug, A., and Roth, M. (1990). *Molecular analysis of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. An immunohistochemical study*. Am J Pathol 137, 711-723.
- Bouchard, M., and Suchowersky, O. (2011). *Tauopathies: one disease or many?* Can J Neurol Sci 38, 547-556.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). *Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathol 82, 239-259.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2011). *Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation?* Acta Neuropathol 121, 589-595.
- Bradley, J.L., Blake, J.C., Chamberlain, S., Thomas, P.K., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. (2000). *Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia*. Hum Mol Genet 9, 275-282.
- Brandt, R., Leger, J., and Lee, G. (1995). *Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain*. J Cell Biol 131, 1327-1340.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders*. In Brain Res Brain Res Rev (Netherlands), pp. 95-130.
- Buee, L., Troquier, L., Burnouf, S., Belarbi, K., Van der Jeugd, A., Ahmed, T., Fernandez-Gomez, F., Caillierez, R., Grosjean, M.E., Begard, S., et al. (2010). *From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death?* Biochem Soc Trans 38, 967-972.
- Bunker, J.M., Kamath, K., Wilson, L., Jordan, M.A., and Feinstein, S.C. (2006). *FTDP-17 mutations compromise the ability of tau to regulate microtubule dynamics in cells*. J Biol Chem 281, 11856-11863.
- Butner, K.A., and Kirschner, M.W. (1991). *Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites*. J Cell Biol 115, 717-730.
- Caparros-Lefebvre, D., and Elbaz, A. (1999). *Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study*. Caribbean Parkinsonism Study Group. In Lancet (England), pp. 281-286.
- Caparros-Lefebvre, D., and Lees, A.J. (2005). *Atypical unclassifiable parkinsonism on Guadeloupe: an environmental toxic hypothesis*. Mov Disord 20 Suppl 12, S114-118.

- Caparros-Lefebvre, D., Sergeant, N., Lees, A., Camuzat, A., Daniel, S., Lannuzel, A., Brice, A., Tolosa, E., Delacourte, A., and Duyckaerts, C. (2002). *Guadeloupean parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy*. *Brain* 125, 801-811.
- Caparros-Lefebvre, D., and Steele, J. (2005). *Atypical parkinsonism on Guadeloupe, comparison with the parkinsonism-dementia complex of Guam, and environmental toxic hypotheses*. In *Environ Toxicol Pharmacol* (Netherlands), pp. 407-413.
- Caparros-Lefebvre, D., Steele, J., Kotake, Y., and Ohta, S. (2006). *Geographic isolates of atypical Parkinsonism and tauopathy in the tropics: possible synergy of neurotoxins*. *Mov Disord* 21, 1769-1771.
- Carrier, M.F., Simon, C., Cassoly, R., and Pradel, L.A. (1984). *Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin*. *Biochimie* 66, 305-311.
- Cavé, A., Figadère, B., Laurens, A., and Cortes, D. (1997). *Acetogenins from Annonaceae*. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, W. Herz, G.W. Kirby, and R.E. Moore, eds. (New York: Springer), pp. 81-288.
- Champy, P., Höglinger, G.U., Feger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guerineau, V., Laprevote, O., Medja, F., Lombes, A., et al. (2004). *Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe*. In *J Neurochem* (England), pp. 63-69.
- Champy, P., Melot, A., Guerineau Eng, V., Gleye, C., Fall, D., Höglinger, G.U., Ruberg, M., Lannuzel, A., Laprevote, O., Laurens, A., et al. (2005). *Quantification of acetogenins in Annona muricata linked to atypical parkinsonism in guadeloupe*. *Mov Disord* 20, 1629-1633.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., and Hirokawa, N. (1992). *Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons*. *Nature* 360, 674-677.
- Cheung, Z.H., and Ip, N.Y. (2004). *Cdk5: mediator of neuronal death and survival*. *Neurosci Lett* 361, 47-51.
- Cheung, Z.H., and Ip, N.Y. (2012). *Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases*. *Trends Cell Biol* 22, 169-175.
- Chin, S.S., and Goldman, J.E. (1996). *Glial inclusions in CNS degenerative diseases*. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 499-508.
- Chirichigno, J.W., Manfredi, G., Beal, M.F., and Albers, D.S. (2002). *Stress-induced mitochondrial depolarization and oxidative damage in PSP cybrids*. *Brain Res* 951, 31-35.
- Chirita, C.N., and Kuret, J. (2004). *Evidence for an intermediate in tau filament formation*. *Biochemistry* 43, 1704-1714.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977a). *Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly*. In *J Mol Biol* (England), pp. 227-247.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977b). *Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin*. In *J Mol Biol* (England), pp. 207-225.

- Conrad, C., Andreadis, A., Trojanowski, J.Q., Dickson, D.W., Kang, D., Chen, X., Wiederholt, W., Hansen, L., Masliah, E., Thal, L.J., *et al.* (1997). *Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy*. *Ann Neurol* 41, 277-281.
- Crowther, R.A. (1991). *Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2288-2292.
- Cruz-Orive, L.M. (1990). *On the empirical variance of a fractionator estimate*. In *Journal of Microscience*, pp. 89-95.
- D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V.M., Bird, T.D., and Schellenberg, G.D. (1999). *Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5598-5603.
- David, D.C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2002). *Proteasomal degradation of tau protein*. *J Neurochem* 83, 176-185.
- Degli Esposti, M., Ghelli, A., Ratta, M., Cortes, D., and Estornell, E. (1994). *Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I)*. *Biochem J* 301 (Pt 1), 161-167.
- Deininger, M.H., Meyermann, R., and Schluesener, H.J. (2002). *The allograft inflammatory factor-1 family of proteins*. *FEBS Lett* 514, 115-121.
- Delacourte, A., and Buee, L. (2000). *Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders*. *Curr Opin Neurol* 13, 371-376.
- DeTure, M., Ko, L.W., Easson, C., and Yen, S.H. (2002). *Tau assembly in inducible transfectants expressing wild-type or FTDP-17 tau*. *Am J Pathol* 161, 1711-1722.
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). *Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau*. *Mol Biol Cell* 3, 1141-1154.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., and Lee, Y.L. (2000). *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. *Neurochem Res* 25, 1439-1451.
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., and Gerstl, B. (1971). *An acidic protein isolated from fibrous astrocytes*. *Brain Res* 28, 351-354.
- Escobar-Khondiker, M., Höllerhage, M., Muriel, M.P., Champy, P., Bach, A., Depienne, C., Respondek, G., Yamada, E.S., Lannuzel, A., Yagi, T., *et al.* (2007). *Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons*. In *J Neurosci (United States)*, pp. 7827-7837.
- Fath, T., Eidenmuller, J., and Brandt, R. (2002). *Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease*. *J Neurosci* 22, 9733-9741.
- Felgner, H., Frank, R., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., Ludin, B., Matus, A., and Schliwa, M. (1997). *Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules*. *J Cell Biol* 138, 1067-1075.

- Foster, N.L., Wilhelmsen, K., Sima, A.A., Jones, M.Z., D'Amato, C.J., and Gilman, S. (1997). *Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants*. *Ann Neurol* 41, 706-715.
- Fuchs, E., and Weber, K. (1994). *Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease*. *Annu Rev Biochem* 63, 345-382.
- Galvan, M., David, J.P., Delacourte, A., Luna, J., and Mena, R. (2001). *Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: A confocal study with phospho-tau antibody, AD2*. *J Alzheimers Dis* 3, 417-425.
- Garcia-Sierra, F., Ghoshal, N., Quinn, B., Berry, R.W., and Binder, L.I. (2003). *Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis* 5, 65-77.
- Georgieff, I.S., Liem, R.K., Couchie, D., Mavilia, C., Nunez, J., and Shelanski, M.L. (1993). *Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems*. *J Cell Sci* 105 (Pt 3), 729-737.
- Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A., and Cohen, P. (1997). *Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases*. In *FEBS Lett* (Netherlands), pp. 57-62.
- Goedert, M., and Jakes, R. (1990). *Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization*. *EMBO J* 9, 4225-4230.
- Goedert, M., and Jakes, R. (2005). *Mutations causing neurodegenerative tauopathies*. In *Biochim Biophys Acta* (Netherlands), pp. 240-250.
- Goedert, M., Jakes, R., and Crowther, R.A. (1999). *Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments*. *FEBS Lett* 450, 306-311.
- Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R.A., Six, J., Lubke, U., Vandermeeren, M., Cras, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1993). *The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5066-5070.
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Smith, M.J., and Crowther, R.A. (1996). *Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans*. *Nature* 383, 550-553.
- Goedert, M., Sautmtira, S., Jakes, R., Smith, M.J., Kamibayashi, C., White, C.L., 3rd, and Sontag, E. (2000). *Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations*. *J Neurochem* 75, 2155-2162.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989a). *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease*. In *Neuron* (United States), pp. 519-526.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., and Crowther, R.A. (1989b). *Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain*. *EMBO J* 8, 393-399.

- Goldbaum, O., Oppermann, M., Handschuh, M., Dabir, D., Zhang, B., Forman, M.S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., and Richter-Landsberg, C. (2003). *Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid*. *J Neurosci* 23, 8872-8880.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Cuadros, R., Hernandez, F., and Avila, J. (2006). *Extracellular tau is toxic to neuronal cells*. In *FEBS Lett* (Netherlands), pp. 4842-4850.
- Gong, C.X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2005). *Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease*. *J Neural Transm* 112, 813-838.
- Gong, C.X., Liu, F., Wu, G., Rossie, S., Wegiel, J., Li, L., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2004). *Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5*. In *J Neurochem* (England), pp. 298-310.
- Gong, C.X., Singh, T.J., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1993). *Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain*. *J Neurochem* 61, 921-927.
- Goode, B.L., and Feinstein, S.C. (1994). *Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau*. *J Cell Biol* 124, 769-782.
- Gotz, J., Chen, F., Barmettler, R., and Nitsch, R.M. (2001). *Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau*. *J Biol Chem* 276, 529-534.
- Gray, E.G., Paula-Barbosa, M., and Roher, A. (1987). *Alzheimer's disease: paired helical filaments and cytomembranes*. *Neuropathol Appl Neurobiol* 13, 91-110.
- Gundersen, H.J. (1986). *Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson*. *J Microsc* 143, 3-45.
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B., Kieu, K., and Nielsen, J. (1999). *The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered*. *J Microsc* 193, 199-211.
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1994). *Domains of tau protein and interactions with microtubules*. *Biochemistry* 33, 9511-9522.
- Hallows, J.L., Chen, K., DePinho, R.A., and Vincent, I. (2003). *Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice*. *J Neurosci* 23, 10633-10644.
- Hanger, D.P., Anderton, B.H., and Noble, W. (2009). *Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease*. *Trends Mol Med* 15, 112-119.
- Hauw, J.J., Verny, M., Delaere, P., Cervera, P., He, Y., and Duyckaerts, C. (1990). *Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging*. *Neurosci Lett* 119, 182-186.
- Henriquez, J.P., Cross, D., Vial, C., and Maccioni, R.B. (1995). *Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types*. *Cell Biochem Funct* 13, 239-250.
- Hernandez, F., and Avila, J. (2007). *Tauopathies*. *Cell Mol Life Sci* 64, 2219-2233.

- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M.W., and Martin, D.W., Jr. (1989). *Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains.* Mol Cell Biol 9, 1381-1388.
- Höglinger, G.U., Carrard, G., Michel, P.P., Medja, F., Lombes, A., Ruberg, M., Friguet, B., and Hirsch, E.C. (2003a). *Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease.* J Neurochem 86, 1297-1307.
- Höglinger, G.U., Feger, J., Prigent, A., Michel, P.P., Parain, K., Champy, P., Ruberg, M., Oertel, W.H., and Hirsch, E.C. (2003b). *Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats.* J Neurochem 84, 491-502.
- Höglinger, G.U., Huppertz, H.J., Wagenpfeil, S., Andres, M.V., Belloch, V., Leon, T., and Del Ser, T. (2014). *Tideglusib reduces progression of brain atrophy in progressive supranuclear palsy in a randomized trial.* Mov Disord 29, 479-487.
- Höglinger, G.U., Lannuzel, A., Khondiker, M.E., Michel, P.P., Duyckaerts, C., Feger, J., Champy, P., Prigent, A., Medja, F., Lombes, A., et al. (2005). *The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy.* J Neurochem 95, 930-939.
- Höllerhage, M., Matusch, A., Champy, P., Lombes, A., Ruberg, M., Oertel, W.H., and Höglinger, G.U. (2009). *Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies.* Exp Neurol 220, 133-142.
- Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., et al. (1998). *Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17.* Science 282, 1914-1917.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17.* Nature 393, 702-705.
- Hwang, S.C., Jhon, D.Y., Bae, Y.S., Kim, J.H., and Rhee, S.G. (1996). *Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid.* J Biol Chem 271, 18342-18349.
- Ikeuchi, T., Imamura, T., Kawase, Y., Kitade, Y., Tsuchiya, M., Tokutake, T., Kasuga, K., Yajima, R., Tsukie, T., Miyashita, A., et al. (2011). *Evidence for a Common Founder and Clinical Characteristics of Japanese Families with the MAPT R406W Mutation.* Dement Geriatr Cogn Dis Extra 1, 267-275.
- Ikeuchi, T., Kaneko, H., Miyashita, A., Nozaki, H., Kasuga, K., Tsukie, T., Tsuchiya, M., Imamura, T., Ishizu, H., Aoki, K., et al. (2008). *Mutational analysis in early-onset familial dementia in the Japanese population. The role of PSEN1 and MAPT R406W mutations.* Dement Geriatr Cogn Disord 26, 43-49.
- Imai, Y., Ibata, I., Ito, D., Ohsawa, K., and Kohsaka, S. (1996). *A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage.* Biochem Biophys Res Commun 224, 855-862.
- Iqbal, K., Zaidi, T., Thompson, C.H., Merz, P.A., and Wisniewski, H.M. (1984). *Alzheimer paired helical filaments: bulk isolation, solubility, and protein composition.* Acta Neuropathol 62, 167-177.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., and Kohsaka, S. (1998). *Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1.* Brain Res Mol Brain Res 57, 1-9.

- Kar, S., Fan, J., Smith, M.J., Goedert, M., and Amos, L.A. (2003). *Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol*. EMBO J 22, 70-77.
- Katzenschlager, R., Cardoso, A., Avila Cobo, M.R., Tolosa, E., and Lees, A.J. (2003). *Unclassifiable parkinsonism in two European tertiary referral centres for movement disorders*. Mov Disord 18, 1123-1131.
- Keith-Rokosh, J., and Ang, L.C. (2008). *Progressive supranuclear palsy: a review of co-existing neurodegeneration*. Can J Neurol Sci 35, 602-608.
- Keller, J.N., Hanni, K.B., and Markesbery, W.R. (2000). *Impaired proteasome function in Alzheimer's disease*. J Neurochem 75, 436-439.
- Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., von Bergen, M., Gazova, Z., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.M. (2006). *Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs*. In J Biol Chem (United States), pp. 1205-1214.
- Komori, T., Arai, N., Oda, M., Nakayama, H., Mori, H., Yagishita, S., Takahashi, T., Amano, N., Murayama, S., Murakami, S., et al. (1998). *Astrocytic plaques and tufts of abnormal fibers do not coexist in corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy*. Acta Neuropathol 96, 401-408.
- Kopke, E., Tung, Y.C., Shaikh, S., Alonso, A.C., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (1993). *Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease*. J Biol Chem 268, 24374-24384.
- Kouri, N., Whitwell, J.L., Josephs, K.A., Rademakers, R., and Dickson, D.W. (2011). *Corticobasal degeneration: a pathologically distinct 4R tauopathy*. Nat Rev Neurol 7, 263-272.
- Ksiezak-Reding, H., Liu, W.K., and Yen, S.H. (1992). *Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments*. In Brain Res (Netherlands), pp. 209-219.
- Ksiezak-Reding, H., and Wall, J.S. (1994). *Mass and physical dimensions of two distinct populations of paired helical filaments*. Neurobiol Aging 15, 11-19.
- Kumar, V., Tewary, D.K., Ravindranath, S.D., and Shanker, A. (2006). *Investigation in tea on fate of fenazaquin residue and its transfer in brew*. Food Chem Toxicol 44, 596-600.
- Kuret, J., Chirita, C.N., Congdon, E.E., Kannanayakal, T., Li, G., Necula, M., Yin, H., and Zhong, Q. (2005a). *Pathways of tau fibrillization*. In Biochim Biophys Acta (Netherlands), pp. 167-178.
- Kuret, J., Congdon, E.E., Li, G., Yin, H., Yu, X., and Zhong, Q. (2005b). *Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization*. Microsc Res Tech 67, 141-155.
- Kuzuhara, S., Kokubo, Y., Sasaki, R., Narita, Y., Yabana, T., Hasegawa, M., and Iwatsubo, T. (2001). *Familial amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii Peninsula of Japan: clinical and neuropathological study and tau analysis*. Ann Neurol 49, 501-511.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science 219, 979-980.

- Lannuzel, A., Höglinger, G.U., Verhaeghe, S., Gire, L., Belson, S., Escobar-Khondiker, M., Poullain, P., Oertel, W.H., Hirsch, E.C., Dubois, B., *et al.* (2007). *Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes?* In *Brain* (England), pp. 816-827.
- Lannuzel, A., Michel, P.P., Caparros-Lefebvre, D., Abaul, J., Hocquemiller, R., and Ruberg, M. (2002). *Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe.* In *Mov Disord* (United States: 2002 Movement Disorder Society.), pp. 84-90.
- Lannuzel, A., Michel, P.P., Höglinger, G.U., Champy, P., Jousset, A., Medja, F., Lombes, A., Darios, F., Gleye, C., Laurens, A., *et al.* (2003). *The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism.* In *Neuroscience* (United States), pp. 287-296.
- Lee, G., Neve, R.L., and Kosik, K.S. (1989). *The microtubule binding domain of tau protein.* In *Neuron* (United States), pp. 1615-1624.
- Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., and Panchamoorthy, G. (1998). *Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases.* *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3167-3177.
- Lee, V.M., Goedert, M., and Trojanowski, J.Q. (2001). *Neurodegenerative tauopathies.* In *Annu Rev Neurosci* (United States), pp. 1121-1159.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., *et al.* (1998). *The ubiquitin pathway in Parkinson's disease.* *Nature* 395, 451-452.
- Lindquist, S.G., Holm, I.E., Schwartz, M., Law, I., Stokholm, J., Batbayli, M., Waldemar, G., and Nielsen, J.E. (2008). *Alzheimer disease-like clinical phenotype in a family with FTDP-17 caused by a MAPT R406W mutation.* *Eur J Neurol* 15, 377-385.
- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). *Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly.* *J Biol Chem* 259, 5301-5305.
- Litvan, I., Agid, Y., Calne, D., Campbell, G., Dubois, B., Duvoisin, R.C., Goetz, C.G., Golbe, L.I., Grafman, J., Growdon, J.H., *et al.* (1996a). *Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop.* *Neurology* 47, 1-9.
- Litvan, I., Hauw, J.J., Bartko, J.J., Lantos, P.L., Daniel, S.E., Horoupian, D.S., McKee, A., Dickson, D., Baner, C., Tabaton, M., *et al.* (1996b). *Validity and reliability of the preliminary NINDS neuropathologic criteria for progressive supranuclear palsy and related disorders.* *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 97-105.
- Lodi, R., Schapira, A.H., Manners, D., Styles, P., Wood, N.W., Taylor, D.J., and Warner, T.T. (2000). *Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy.* *Ann Neurol* 48, 72-76.
- Lovestone, S., Hartley, C.L., Pearce, J., and Anderton, B.H. (1996). *Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules.* In *Neuroscience* (United States), pp. 1145-1157.

- Maccioni, R.B., Otth, C., Concha, II, and Munoz, J.P. (2001). *The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology*. In Eur J Biochem (Germany), pp. 1518-1527.
- Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A., and Takashima, A. (2007). *Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments*. Biochemistry 46, 3856-3861.
- Mawal-Dewan, M., Henley, J., Van de Voorde, A., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1994). *The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases*. J Biol Chem 269, 30981-30987.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E.M. (1984). *Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease*. Neurology 34, 939-944.
- Mena, R., Edwards, P.C., Harrington, C.R., Mukaetova-Ladinska, E.B., and Wischik, C.M. (1996). *Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol 91, 633-641.
- Messing, L., Decker, J.M., Joseph, M., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.M. (2013). *Cascade of tau toxicity in inducible hippocampal brain slices and prevention by aggregation inhibitors*. Neurobiol Aging 34, 1343-1354.
- Mocanu, M.M., Nissen, A., Eckermann, K., Khlistunova, I., Biernat, J., Drexler, D., Petrova, O., Schonig, K., Bujard, H., Mandelkow, E., et al. (2008). *The potential for beta-structure in the repeat domain of tau protein determines aggregation, synaptic decay, neuronal loss, and coassembly with endogenous Tau in inducible mouse models of tauopathy*. In J Neurosci (United States), pp. 737-748.
- Morales-Garcia, J.A., Luna-Medina, R., Alonso-Gil, S., Sanz-Sancristobal, M., Palomo, V., Gil, C., Santos, A., Martinez, A., and Perez-Castillo, A. (2012). *Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo*. ACS Chem Neurosci 3, 963-971.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A. (1986). *Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2*. Brain Res 387, 271-280.
- Novak, M., Kabat, J., and Wischik, C.M. (1993). *Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament*. EMBO J 12, 365-370.
- Oberlies, N.H., Chang, C.J., and McLaughlin, J.L. (1997). *Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells*. In J Med Chem (United States), pp. 2102-2106.
- Ostojic, J., Elfgren, C., Passant, U., Nilsson, K., Gustafson, L., Lannfelt, L., and Froelich Fabre, S. (2004). *The tau R406W mutation causes progressive presenile dementia with bitemporal atrophy*. Dement Geriatr Cogn Disord 17, 298-301.
- Panda, D., Goode, B.L., Feinstein, S.C., and Wilson, L. (1995). *Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau*. Biochemistry 34, 11117-11127.

- Perez, M., Lim, F., Arrasate, M., and Avila, J. (2000). *The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules*. J Neurochem 74, 2583-2589.
- Pevalova, M., Filipcik, P., Novak, M., Avila, J., and Iqbal, K. (2006). *Post-translational modifications of tau protein*. Bratisl Lek Listy 107, 346-353.
- Plattner, F., Angelo, M., and Giese, K.P. (2006). *The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation*. J Biol Chem 281, 25457-25465.
- Rademakers, R., Dermaut, B., Peeters, K., Cruts, M., Heutink, P., Goate, A., and Van Broeckhoven, C. (2003). *Tau (MAPT) mutation Arg406Trp presenting clinically with Alzheimer disease does not share a common founder in Western Europe*. Hum Mutat 22, 409-411.
- Reed, L.A., Grabowski, T.J., Schmidt, M.L., Morris, J.C., Goate, A., Solodkin, A., Van Hoesen, G.W., Schelper, R.L., Talbot, C.J., Wragg, M.A., et al. (1997). *Autosomal dominant dementia with widespread neurofibrillary tangles*. Ann Neurol 42, 564-572.
- Rendon, A., Jung, D., and Jancsik, V. (1990). *Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria*. Biochem J 269, 555-556.
- Saigoh, K., Wang, Y.L., Suh, J.G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., et al. (1999). *Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice*. Nat Genet 23, 47-51.
- Saito, Y., Geyer, A., Sasaki, R., Kuzuhara, S., Nanba, E., Miyasaka, T., Suzuki, K., and Murayama, S. (2002). *Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation*. Neurology 58, 811-813.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., et al. (2005). *Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function*. Science 309, 476-481.
- Schapira, A.H. (1998). *Human complex I defects in neurodegenerative diseases*. Biochim Biophys Acta 1364, 261-270.
- Schapira, A.H. (2008). *Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. Lancet Neurol 7, 97-109.
- Schapira, A.H. (2010). *Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration*. Exp Neurol 224, 331-335.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. (1989). *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. In Lancet (England), p. 1269.
- Schmitz, C. (1998). *Variation of fractionator estimates and its prediction*. In Anat Embryol (Berl), pp. 371-397.
- Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., and Quinn, N.P. (1999). *Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study*. Lancet 354, 1771-1775.
- Sengupta, A., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Singh, T.J. (1997). *Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5*. Mol Cell Biochem 167, 99-105.

- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., *et al.* (2000). *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase*. Nat Genet 25, 302-305.
- Slomianka, L., and West, M.J. (2005). *Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats*. In Neuroscience (United States), pp. 757-767.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Lee, G., Brandt, R., Kamibayashi, C., Kuret, J., White, C.L., 3rd, Mumby, M.C., and Bloom, G.S. (1999). *Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies*. J Biol Chem 274, 25490-25498.
- Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998). *Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia*. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 7737-7741.
- Stamelou, M., Pilatus, U., Reuss, A., Magerkurth, J., Eggert, K.M., Knake, S., Ruberg, M., Schade-Brittinger, C., Oertel, W.H., and Höglinger, G.U. (2009). *In vivo evidence for cerebral depletion in high-energy phosphates in progressive supranuclear palsy*. J Cereb Blood Flow Metab 29, 861-870.
- Stamelou, M., Reuss, A., Pilatus, U., Magerkurth, J., Niklowitz, P., Eggert, K.M., Krisp, A., Menke, T., Schade-Brittinger, C., Oertel, W.H., *et al.* (2008). *Short-term effects of coenzyme Q10 in progressive supranuclear palsy: a randomized, placebo-controlled trial*. Mov Disord 23, 942-949.
- Steele, J.C., Caparros-Lefebvre, D., Lees, A.J., and Sacks, O.W. (2002). *Progressive supranuclear palsy and its relation to pacific foci of the parkinsonism-dementia complex and Guadeloupean parkinsonism*. In Parkinsonism Relat Disord (England: 2002 Elsevier Science Ltd.), pp. 39-54.
- Steele, J.C., Richardson, J.C., and Olszewski, J. (1964). *PROGRESSIVE SUPRANUCLEAR PALSY. A HETEROGENEOUS DEGENERATION INVOLVING THE BRAIN STEM, BASAL GANGLIA AND CEREBELLUM WITH VERTICAL GAZE AND PSEUDOBULBAR PALSY, NUCHAL DYSTONIA AND DEMENTIA*. Arch Neurol 10, 333-359.
- Sterio, D.C. (1984). *The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector*. In Journal of Microscopy, pp. 134(Pt 132):127-136.
- Stoothoff, W.H., and Johnson, G.V. (2005). *Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences*. In Biochim Biophys Acta (Netherlands), pp. 280-297.
- Swerdlow, R.H., Golbe, L.I., Parks, J.K., Cassarino, D.S., Binder, D.R., Grawey, A.E., Litvan, I., Bennett, J.P., Jr., Wooten, G.F., and Parker, W.D. (2000). *Mitochondrial dysfunction in cybrid lines expressing mitochondrial genes from patients with progressive supranuclear palsy*. J Neurochem 75, 1681-1684.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S., *et al.* (1998). *Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau*. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 9637-9641.
- Tanaka, T., Zhong, J., Iqbal, K., Trenkner, E., and Grundke-Iqbal, I. (1998). *The regulation of phosphorylation of tau in SY5Y neuroblastoma cells: the role of protein phosphatases*. In FEBS Lett (Netherlands), pp. 248-254.

- Tanemura, K., Murayama, M., Akagi, T., Hashikawa, T., Tominaga, T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H., and Takashima, A. (2002). *Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau*. J Neurosci 22, 133-141.
- Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Chui, D.H., Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, K., Murayama, M., Ishiguro, K., *et al.* (2002). *Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13896-13901.
- Tolosa, E., Litvan, I., Höglinger, G.U., Burn, D., Lees, A., Andres, M.V., Gomez-Carrillo, B., Leon, T., and Del Ser, T. (2014). *A phase 2 trial of the GSK-3 inhibitor tideglusib in progressive supranuclear palsy*. Mov Disord 29, 470-478.
- van Swieten, J.C., Stevens, M., Rosso, S.M., Rizzu, P., Joosse, M., de Koning, I., Kamphorst, W., Ravid, R., Spillantini, M.G., Niermeijer, *et al.* (1999). *Phenotypic variation in hereditary frontotemporal dementia with tau mutations*. Ann Neurol 46, 617-626.
- Wakabayashi, K., and Takahashi, H. (2004). *Pathological heterogeneity in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration*. Neuropathology 24, 79-86.
- Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). *Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase-2A, -2B and -1*. In Brain Res Mol Brain Res (Netherlands), pp. 200-208.
- Warner, T.T., and Schapira, A.H. (2003). *Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease*. Ann Neurol 53 Suppl 3, S16-23; discussion S23-15.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). *A protein factor essential for microtubule assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A 72, 1858-1862.
- Wen, Y., Planel, E., Herman, M., Figueroa, H.Y., Wang, L., Liu, L., Lau, L.F., Yu, W.H., and Duff, K.E. (2008). *Interplay between cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 beta mediated by neuregulin signaling leads to differential effects on tau phosphorylation and amyloid precursor protein processing*. J Neurosci 28, 2624-2632.
- Wenning, G.K., Litvan, I., and Tolosa, E. (2011). *Milestones in atypical and secondary Parkinsonisms*. Mov Disord 26, 1083-1095.
- West, M.J. (1993). *New stereological methods for counting neurons*. Neurobiol Aging 14, 275-285.
- West, M.J., Slomianka, L., and Gundersen, H.J. (1991). *Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator*. Anat Rec 231, 482-497.
- Wilhelmsen, K.C., Lynch, T., Pavlou, E., Higgins, M., and Nygaard, T.G. (1994). *Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22*. Am J Hum Genet 55, 1159-1165.
- Williams, D.R. (2006). *Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau*. Intern Med J 36, 652-660.

Yamada, E.S., Respondek, G., Mussner, S., de Andrade, A., Höllerhage, M., Depienne, C., Rastetter, A., Tarze, A., Friguet, B., Salama, M., *et al.* (2014). *Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice.* Exp Neurol 253, 113-125.

Zafra-Polo, M.C., Gonzalez, M.C., Estornell, E., Sahpaz, S., and Cortes, D. (1996). *Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I.* In Phytochemistry (United States), pp. 253-271.

Zhang, B., Higuchi, M., Yoshiyama, Y., Ishihara, T., Forman, M.S., Martinez, D., Joyce, S., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2004). *Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy.* In J Neurosci (United States), pp. 4657-4667.

Zhang, Y.J., Xu, Y.F., Chen, X.Q., Wang, X.C., and Wang, J.Z. (2005). *Nitration and oligomerization of tau induced by peroxynitrite inhibit its microtubule-binding activity.* In FEBS Lett (Netherlands), pp. 2421-2427.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer in Marburg und während meines Praktischen Jahres in Siegen, Winterthur und Berlin, waren die nachfolgenden Damen und Herren, denen ich an dieser Stelle herzlich danke:

In Marburg:

Aigner, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Baumann, Bartsch, Bien, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Donner-Banzhoff, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg C., Görg, K., Gress, Hasilik, Hegele, Hertl, Höffken, Höglinger, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Kann, Kanngießer, Kill, Klose, Köhler, König, Koolmann, Kroll, Kühnert, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandic, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Plant, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rolfes, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schrader, Seitz, Sesterhenn, Steiniger, Strempel, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wündisch, Wulf.

In Siegen:

Burghard, Pingel, Pritsch.

In Winterthur:

Decurtins, Hotz, Jandali, Käch, Rudin, Wigger.

In Berlin:

Arastéh, Kienapfel, Mackert, Müller.

8.2 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. W. H. Oertel für die Möglichkeit zur Durchführung der Dissertation an seiner Klinik, sowie für die Durchsicht der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. U. Höglinger gilt ein besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Beratung und Unterstützung in allen inhaltlichen Fragen.

Frau Dr. Elizabeth Yamada danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung bei der Umsetzung der Arbeit.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für experimentelle Neurologie für die gute Zusammenarbeit, anregende Diskussionen und ein motivierendes Arbeitsumfeld. Besonderer Dank gilt Dr. Wei-Hua Chiu, Dr. Thomas Carlsson und Herrn Robert Rottscholl für die konstruktive Beratung, freundschaftliche Zusammenarbeit und Motivation, auch in schweren Zeiten. Außerdem danke ich Frau Silke Caspari und Frau Sabine Anfimov, die mir in allen praktischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Frau Theresa Wilfing danke ich für ihr Engagement beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Severin Schweisthal für Korrektur, stetige persönliche Unterstützung und vieles mehr.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen meiner Familie, durch deren Verständnis und Unterstützung es mir ermöglicht wurde, meinen Weg zu gehen.